ADENYLATCYCLASE-SYSTEM VON LANGERHANSSCHEN INSELN UND RIN-A2-ZELLEN: BEDEUTUNG VON THIOLGRUPPEN UNTERSUCHUNGEN MIT FORSKOLIN, GppNHp, DIAMID UND N-ETHYLMALEIMID (NEM)

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard - Karls - Universität zu Tübingen

vorgelegt von
JOACHIM TRIER
aus Ravensburg

1986

ADENYLATCYCLASE-SYSTEM VON LANGERHANSSCHEN INSELN UND RIN-A2-ZELLEN: BEDEUTUNG VON THIOLGRUPPEN UNTERSUCHUNGEN MIT FORSKOLIN, GppNHp, DIAMID UND N-ETHYLMALEIMID (NEM)

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard - Karls - Universität zu Tübingen

vorgelegt von
JOACHIM TRIER
aus Ravensburg

1986

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Juli 1986

Dekan: Prof. Dr. K.-A. Kovar

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.P.T. Ammon

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Reinhard

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon waren die Herren Professoren

E.J. Verspohl (Pharmakologie)

E. Reinhard (Pharmazeutische Biologie)

H. Auterhoff, K.-A. Kovar, J.E. Schultz (Pharmazeutische Chemie)

E. Graf (Pharmazeutische Technologie)

E. Lindner, E. Bayer, M.Hanack (Chemie)

K. Botzenhardt (med. Mikrobiologie)

H. Seiler (Physik)

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde im Mai 1983 unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H.P.T. Ammon am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen begonnen und im Februar 1986 abgeschlossen.

Herrn Professor Dr. H.P.T. Ammon
danke ich für die Überlassung des Themas, sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und seine freundliche Unterstützung.

Herrn Dr. U. Essig
danke ich für seine umfassende Einführung in die Methodik.

Frau I. Breuning
danke ich für ihre engagierte und ausdauernde Hilfe an Versuchstagen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Herrn Professor Ammon für das angenehme Arbeitsklima und die ständige Diskussionsbereitschaft bedanken.

A B K Ü R Z U N G E N

AC	Adenylatcyclase
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Aph	Aminophyllin (=Theophyllin-ethylendiamin)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
C	katalytische Einheit der Adenylatcyclase
cAMP	cyclisches Adenosin-3':5'-monophosphat
DTT	Dithiotreitol
E	Einheit
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-acetat
fmol	femtomol (10^{-15}mol)
GppNHp	Guanosin-5'-(ß,y-imido)-triphosphat
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
min	Minuten
M	molar
m	mol
mmol	millimol (10^{-3}mol)
umol	mikromol (10^{-6}mol)
N_i	inhibitorisches Nukleotid-bindendes Protein
N_s	stimulatorisches Nukleotid-bindendes Protein
NEM	N-Ethyl-Maleimid
nmol	nanomol (10^{-9}mol)
n.s.	nicht signifikant
PDE	Phosphodiesterase
pmol	picomol (10^{-12}mol)

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTU	Propylthiouracil
RIA	Radioimmunoassay
SDS	Natrium-dodecylsulfat
SEM	standard error of the mean
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Stand der Forschung	1
1.1.1.	Regulation des Blutzuckerspiegels	1
1.1.2.	Mechanismus der Glucose-induzierten Insulinsekretion	4
1.1.2.1.	Vermittlung des Glucosereizes	5
1.1.2.2.	Calcium-induzierte Exocytose von Insulin	7
1.1.2.3.	Beteiligung von cAMP bei der Glucose-induzierten Insulinsekretion	9
1.1.2.4.	Bedeutung von Thiolen und Reduktionsäquivalenten für die Insulinsekretion	14
1.1.3.	Adenylatcyclase	18
1.1.3.1.	Aufbau der Adenylatcyclase	18
1.1.3.2.	Regulationsmechanismen im AC-System	25
1.1.3.3.	Bedeutung von Thiolen bei der Regulation der Adenylatcyclase	29
1.1.4.	Second messenger-Systeme: Der Phosphoinositol-Metabolismus	33
1.2.	Fragestellung	38
1.2.1.	Erstellung einer Methodik zur Messung der AC-Aktivität in Langerhansschen Inseln	38
1.2.2.	Zur Bedeutung von Thiolen für die Regulation der AC durch stimulatorische und inhibitorische Substanzen	39
2.	MATERIAL	43
2.1.	Versuchstiere	43
2.2.	Geräte	43
2.3.	Chemikalien und Enzyme	44
2.4.	Nähr- und Reagenslösungen	45

2.4.1. Hanks' Puffer 45

2.4.2. Stammlösungen zur Herstellung der Pufferlösungen während des Versuchstages 46

2.4.2.1. Stammlösungen in Tris 46

2.4.2.2. Stammlösungen in anderen Lösungsmitteln 47

2.4.2.3. Zur Verwendung des Lösungsmittels Ethanol bei der Herstellung der Forskolin-Stammlösung 48

2.4.3. Pufferlösungen 49

2.4.3.1. Waschpuffer 49

2.4.3.2. Homogenisationspuffer 50

2.4.3.3. Membranpuffer 50

2.4.3.4. Testpuffer 50

2.4.4. Natriumacetat-Puffer 51

2.4.5. Acetylierungsgemisch 51

2.4.6. Nährmedium für RIN-A2-Zellen 51

2.4.7. Zu untersuchende Substanzen 51

3. METHODIK 52

3.1. Versuchsplanung 52

3.2. Einzelschritte des Versuchsablaufes 54

3.3. Schematische Darstellung des Versuchsablaufes 54

3.4. Beschreibung des Versuchsablaufes 56

3.4.1. Gewinnung des Ausgangsmaterials: Langerhanssche Inseln oder RIN-A2-Zellen 56

3.4.1.1. Methode zur Gewinnung und Isolierung Langerhansscher Inseln 56

3.4.1.2. Charakterisierung und Aufzucht der Tumor-Zellinie RIN-A2; Gewinnung der Einzelzellen 59

3.4.2. Membranpräparation 61

3.4.3. Adenylatcyclase-Test 63

3.4.3.1. Versuch zur Basalaktivität und Stimulation der AC 63

3.4.3.2. Versuche zur Hemmung der AC 64

3.4.3.3. Versuche mit Thioloxidantien 65

3.4.4. cAMP-Radioimmunoassay 67

3.4.4.1. Prinzip des RIA 67

3.4.4.2. Durchführung des RIA 69

3.4.5. Proteinbestimmung 71

3.4.5.1. Lowry-Proteinbestimmung modifiziert nach Peterson 71

3.4.5.2. Dye-Proteinbestimmung modifiziert nach Biorad 72

3.4.6. Proteinbestimmungsresultate 74

3.4.6.1. Proteinbestimmungen aus Homogenaten und Membranpräparationen Langerhansscher Inseln 74

3.4.6.2. Proteinbestimmungen aus Homogenaten und Membranpräparationen von RIN-A2-Zellen 74

3.5. Versuchsauswertung 76

3.6. Statistik 77

4. ERGEBNISSE DES METHODISCHEN TEILS 78

4.1. Gewinnung von Zellmembranen aus Langerhansschen Inseln bzw. aus RIN-A2-Zellen 79

4.1.1. Übersicht über die Techniken anderer Arbeitsgruppen 79

4.1.2. Zur Gewinnung der Zellmembranfraktion 80

4.1.2.1. Gesamthomogenat oder Membranpräparation? 80

4.1.2.2. Herstellung des Homogenates 82

4.1.2.3. Isolation der Membranpartikel 84

4.2. Untersuchungen zum in-vitro Testsystem der AC-Aktivitätsmessung 85

4.2.1. Phosphodiesterase-Hemmstoffe 85

4.2.2. Konzentration von ATP; ATP-regenerierendes System 86

4.2.3. Wiederfindungsrate von cAMP im RIA 89

4.2.4. Konzentration von GTP 90

4.2.5. Konzentration von DTT 91

4.2.6. Zeitlinearität des AC-Tests 92

4.2.7. Stimulation mit Natriumfluorid 94

4.2.8. Durchführung des AC-Tests mit (^{32}P)ATP 96

5. VERSUCHSERGEBNISSE 98

5.1. AC-Aktivität Langerhansscher Inseln 98

5.1.1. Stimulation der AC-Aktivität 98

5.1.1.1. Einfluß von Forskolin: Dosis-Wirkungskurve 98

5.1.1.2. Einfluß von GppNHp: Dosis-Wirkungskurve 101

5.1.2. Hemmung der AC-Aktivität; Einfluß von Thioloxidantien 103

5.1.2.1. GppNHp-induzierte Hemmung der Forskolin-stimulierten AC-Aktivität 103

5.1.2.2. Einfluß von Diamid auf die basale und Forskolin-stimulierte AC-Aktivität 105

5.1.2.3. Einfluß von Diamid auf die durch GppNHp induzierte Hemmung der Forskolin-stimulierten AC-Aktivität 107

5.1.2.4. Einfluß von NEM auf die durch GppNHp induzierte Hemmung der Forskolin-stimulierten AC-Aktivität 110

5.1.2.5. Einfluß von NEM auf die durch GTP + Somatostatin induzierte Hemmung der Forskolin-stimulierten AC-Aktivität 111

5.1.3. Einfluß von Propylthiouracil auf die Basalaktivität der AC 114

5.2. AC-Aktivität in RIN-A2-Zellen 116

5.2.1. Basale AC-Aktivität und Stimulation durch Forskolin und Natriumfluorid: Vergleich von Langerhansschen Inseln und RIN-A2-Zellen 116

5.2.2. Hemmung der AC-Aktivität; Einfluß von Thioloxidantien 119

5.2.2.1. Einfluß von NEM auf die Forskolin-stimulierte AC-Aktivität 119

5.2.2.2. Einfluß von NEM auf die durch GppNHp induzierte Hemmung der Forskolin-stimulierten AC-Aktivität 121

5.2.2.3. Einfluß von Diamid auf die basale und Natriumfluorid-stimulierte AC-Aktivität 124

5.2.3. Einfluß von DTT auf die Forskolin-stimulierte AC-Aktivität 126

6. DISKUSSION 129

6.1. cAMP-Gehalt und Adenylatcyclase-Aktivität Langerhansscher Inseln 129

6.2. Methodik der AC-Aktivitätsmessung 130

6.2.1. In Langerhansschen Inseln 130

6.2.2. In RIN-A2-Zellen 135

6.3. Bedeutung von Thiolen bei der Regulation der AC-Aktivität Langerhansscher Inseln 136

6.4. Funktioneller Vergleich der Adenylatcyclase-Systeme in Langerhansschen Inseln und RIN-A2-Zellen; Aspekte ihrer Thiolabhängigkeit 145

7. ZUSAMMENFASSUNG 151

7.1. Fragestellung 151

7.2. Ergebnisse 152

7.3. Schlussfolgerungen 153

8. LITERATURVERZEICHNIS 155

1. EINLEITUNG

1.1. Stand der Forschung

1.1.1. Regulation des Blutzuckerspiegels

Beim gesunden Menschen wird die Höhe des Blutzuckerspiegels in engen Grenzen gehalten. Sie bewegt sich dabei zwischen 50 und 180 mg/% (= 0.5-1.8 mg/ml) (Ammon 1986). Physiologischerweise wird die Blutzuckerkonzentration beeinflußt durch die aus der Leber freigesetzte und die mit der Nahrung aufgenommene Glucosemenge einerseits, und durch die Aufnahme von Glucose in das Gewebe andererseits.

Die basale Regulation des Blutzuckerspiegels ist in Abb. 1.1. dargestellt (mod. nach Unger, 1981).

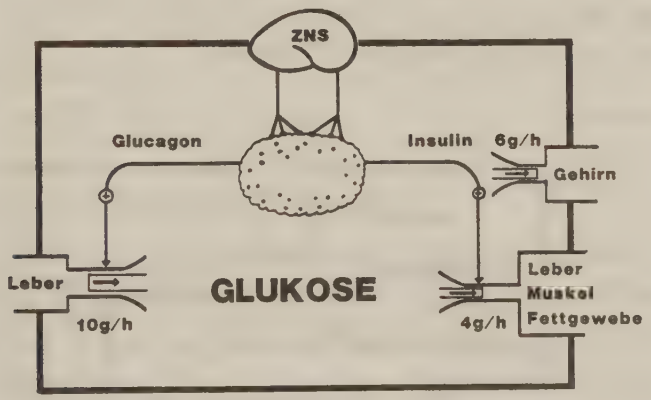

Abb. 1.1.: **Basale Regulation des Blutzuckerspiegels (modifiziert nach Unger, 1981)**

Bei fehlender Nahrungsaufnahme werden aus gespeichertem Leberglykogen und durch Gluconeogenese pro Stunde ca. 10 g Glucose aus der Leber ins Blut abgegeben. 6 g pro Stunde werden bereits vom

Gehirn benötigt, das vollständig auf die Zufuhr von Glucose als Nährstoff angewiesen ist. Weitere 4 g werden pro Stunde von Muskulatur, Fettgewebe und Leber verbraucht.

Eine wesentliche Rolle für die hormonale Steuerung spielt hierbei das endokrine Pankreas. Die Langerhansschen Inseln setzen neben Glucagon aus den A-Zellen, das z.B. 75% der Leberglucose-produktion steuert, insbesondere Insulin frei, mit dessen Hilfe u.a. Glucose in Fettgewebe und Skelettmuskulatur aufgenommen werden kann. Die Wirkungen des Insulins auf Kohlenhydrat-, Protein- und Lipidstoffwechsel in Leber, Muskulatur und Fett-gewebe zielen dabei in erster Linie in Richtung einer Aufnahme von nicht benötigtem Substrat in körpereigene Depots. Die viel-fältigen Wirkungen des Insulins wurden von Ammon (1975) ausführlich beschrieben.

In Abb. 1.2. ist die Regulation des Blutzuckerspiegels bei Nahrungsaufnahme schematisch dargestellt.

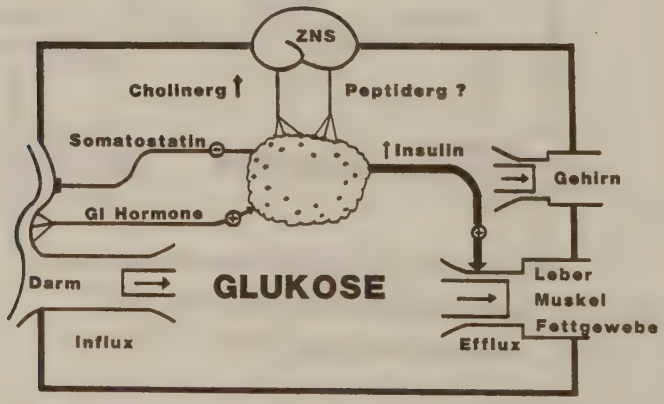

Abb 1.2.: **Regulation des Blutzuckers bei Nahrungsaufnahme (modifiziert nach Unger, 1981)**

Die Resorption von Glucose aus dem Magen-Darm-Trakt führt zu einem Anstieg des Blutzuckerspiegels. Über direkte Wirkung der Glucose auf die B-Zelle und verstärkende Effekte durch gastrointestinale Hormone (="incretins", z.B. GIP (gastrointestinales Polypeptid) und CCK (Cholecystokinin); Verspohl 1986, Ahren 1981) wird vermehrt Insulin sezerniert. Auch cholinerge Reize aus dem vegetativen System und andere aktive Peptide scheinen eine Rolle zu spielen.

Aber auch Hemmechanismen sind vorgesehen: So sorgen Somatostatin (vorwiegend aus D-Zellen Langerhansscher Inseln), sowie Insulin selbst über einen negativen Feedback (Ammon 1976, Verspohl 1980) dafür, daß die Insulinsekretion nicht überschießend abläuft.

Beim Diabetes mellitus ist die Freisetzung von Insulin aus B-Zellen aus verschiedenen Gründen gestört. Während die Ursache beim jugendlichen Diabetes (Typ I) in einer B-Zellschädigung mit Untergang dieser Zellen liegt, wird beim Altersdiabetes (Typ II) eine sogenannte Insulinresistenz beobachtet, d.h. trotz zeitweise überschießender Insulinfreisetzung kommt es nicht zu der notwendigen Glucoseelimination (Ammon 1986).

Um den Ursachen und der Behandlung dieser Stoffwechselerkrankung ein Stück näher zu kommen, steht die Untersuchung des genauen Mechanismus der Glucose-induzierten Insulinsekretion vermehrt im Mittelpunkt forscherischen Interesses. Im Rahmen dieser Forschungsarbeiten entstand die vorliegende Dissertation.

1.1.2. Mechanismus der Glucose-induzierten Insulinsekretion

Der Begriff der Glucose-induzierten Insulinsekretion umfaßt die Vorgänge, die physiologischerweise in der pankreatischen B-Zelle bzw. der gesamten Langerhansschen Insel ablaufen, wenn der Blutzuckerspiegel z.B. nach Nahrungsaufnahme erhöht ist. Unter dem Mechanismus der Glucose-induzierten Insulinsekretion versteht man diejenigen biochemischen Veränderungen, die dem Transport der Insulin-speichernden Granula vorangehen und letztendlich die Exocytose des Insulins bewirken.

Die Ergebnisse der Forschungsarbeiten der letzten Jahrzehnte zeigen, daß die Insulinsekretion aus einem Zusammenspiel vielfältiger biochemischer Prozesse resultiert und von zahlreichen Hormonen, Nährstoffen und Neurotransmittern gesteuert werden kann.

Die zentrale Rolle bei der Insulinsekretion aus pankreatischen B-Zellen kommt der Glucose zu, von der zunächst angenommen wurde, daß sie über Kopplung an einen stereospezifischen Rezeptor an der Zellmembranaußenseite die zur Freisetzung von Insulin nötigen intrazellulären Mechanismen bewirken würde. Diese Hypothese ("regulator-site-model") gilt heute als überholt, nachdem keine Befunde für die Existenz eines Glucose-spezifischen Rezeptors erbracht werden konnten.

Vielmehr sprechen die vorliegenden Resultate dafür, daß die Verstoffwechselung der Glucose den ersten Schritt zur Insulinsekretion darstellt. Nährstoffe, die eine Sekretionsantwort auslösen, scheinen in den Inselzellen entweder als Substrat für den Metabolismus und/oder als Aktivatoren von Schlüssel-Regulatorenzymen zu fungieren (Sener et al. 1984). Den "trigger" (=

Auslöser) glaubt man im intrazellulären Calcium gefunden zu haben (Wollheim und Sharp, 1981), denn Glucose vermag nur in Anwesenheit ausreichender extrazellulärer Ca^{2+}-Konzentrationen die Insulinsekretion auszulösen (Grodsky et al. 1966, Curry et al. 1968). Die Schwellendosis liegt laut Kikuchi (1978) bei etwa 0.1 mM Calcium im Extrazellulärraum. Calcium ist aber auch in der Lage, "per se", also ohne entsprechenden Glucosereiz, Insulin freizusetzen (Karl 1975, Hellman 1976, Devis 1977). Dies wurde als Beweis für die Auslöserfunktion des Calciums gewertet.

1.1.2.1. Vermittlung des Glucosereizes

Von Ashcroft et al. wurde 1980 ein Modell zum Mechanismus der Glucose-induzierten Insulinsekretion vorgeschlagen (Abb. 1.3.):

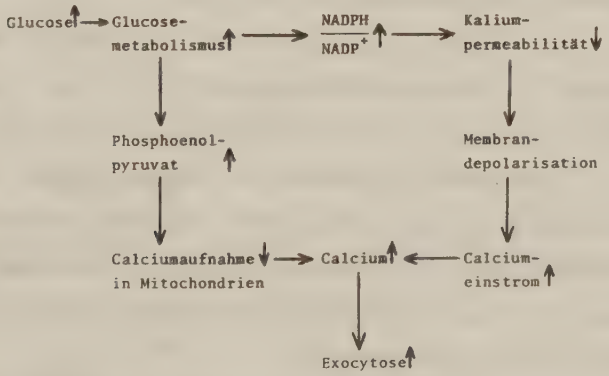

Abb. 1.3.: Stoffwechselveränderungen in der B-Zelle, die zur Zunahme intrazellulären Calciums und zur gesteigerten Exocytose von Insulin führen (Ashcroft 1980).

Sofort nachdem D-Glucose rasch und einheitlich in die B-Zelle aufgenommen worden ist, beginnt die Metabolisierung (Hellman 1971, Matschinsky 1968).

Eine erhöhte intrazelluläre Glucosekonzentration wird zunächst vom Glucokinase-Hexokinasesystem (auch für andere Hexosen) wahrgenommen, indem die freie Glucose zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert wird. Dies stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Glucosemetabolismus dar (Ashcroft und Randle 1970; Hedeskov und Capito 1974).

Ausgehend vom Glucose-6-phosphat erfolgt die weitere Verstoffwechselung hauptsächlich über die Glykolyse, zum geringeren Teil über den Pentosephosphatshunt (PPS). Die Beteiligung des PPS am Metabolismus der Glucose konnte von Ammon und Steinke (1972) demonstriert werden. Beim Ablauf des PPS entstehen dann reduzierte Nikotinamid-nukleotide (NADPH), welche zu einer Erhöhung des NADPH/NADP-Quotienten führen (Verspohl 1979). Nach Henquin (1978 , 1980) hat dies eine verminderte Kaliumpermeabilität der Zellmembran zur Folge.

Da in der pankreatischen B-Zelle das Ruhepotential der Zellmembran ein Kaliumdiffusionspotential ist, d.h. durch Diffusion von K^+-Ionen in den Extrazellulärraum zustande kommt, führt ein verminderter Kaliumefflux zur langsamen Abnahme des Ruhepotentials bis zu einem Schwellenwert. Beim Erreichen dieses Schwellenwertes kommt es zur Öffnung voltabhängiger Calciumkanäle und damit zum passiven Einstrom von Calcium entlang eines Konzentrationsgefälles ins Cytosol.

Der andere Teil des Glucosemetabolismus führt über die Glykolyse zum vermehrten Auftreten von Phosphoenolpyruvat (PEP), das über die Hemmung der ATP-abhängigen Calciumaufnahme in die Mitochondrien ebenfalls zur Zunahme der cytosolischen Ca^{2+}-Konzentration führen soll (Sudgen und Ashcroft, 1978). Allerdings

wurde 1978 von Roos et al. festgestellt, daß PEP eine Schädigung der Mitochondrien von Leberzellen bewirken kann.

1.1.2.2. Calcium-induzierte Exocytose von Insulin

Eine Beteiligung von Mikrotubuli und Mikrofilamenten beim Transport der Insulingranula zur Plasmamembran, dem Ort ihrer Exocytosis, wurde bereits 1968 von Lacy et al. postuliert. Mikrotubuli stellen in der B-Zelle des Pankreas das maßgebliche Strukturelement dar, das die Granula zur Zellmembran hinführt. Die bewegende Kraft soll vom Mikrofilamentsystem ausgehen. Howell und Tyhurst stellten 1982 diesen Vorgang schematisch dar (Abb. 1.4.).

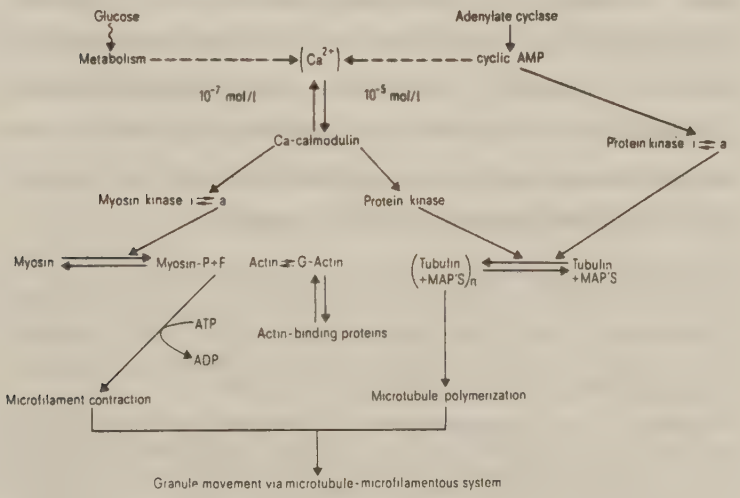

Abb. 1.4.: Regulation des Mikrotubulus-Mikrofilament-Systems und der Insulinfreisetzung durch intrazelluläres Ca^{2+} bzw. Ca-Calmodulin (Howell und Tyhurst 1982).

Gesichert scheint, daß intrazelluläres Calcium zumindest teilweise über Komplexbindung an das calciumabhängige Regulatorprotein Calmodulin wirkt. Die Anwesenheit von Calmodulin in Langerhansschen Inseln der Ratte wurde mehrfach nachgewiesen (Sudgen/Ashcroft 1979, Valverde et al. 1979), ebenso wurde es in der Tumorzellinie RINm5F gefunden (Nelson et al. 1983).

Aus Beobachtungen von MacDonald und Kowluru (1982), daß in Anwesenheit von Inselhomogenaten, Calcium und Calmodulin vermehrt und dosisabhängig (γ-^{32}P)-ATP in Skelettmuskel "myosin light chains" inkorporiert wird, wurde geschlossen, daß, wenn die Bindungsstellen des Calmodulins mit Calcium gesättigt sind, die "myosin light chain kinase" die Phosphorylierung von Myosin katalysieren kann.

Dieses nun aktive Myosin kann mit filamentösem Aktin, das entweder in dieser Calcium-unabhängig polymerisierten filamentösen oder in globulärer Form vorliegt, zum Aktomyosin assoziieren, dem eigentlich wirksamen Bestandteil des Mikrofilamentsystems (Valverde und Malaisse 1984). Unter ATP-Verbrauch findet nun eine Mikrofilamentkontraktion statt, wodurch die Sekretionsgranula in Richtung Plasmamembran transportiert werden.

Calcium-Calmodulin vermag aber auch andere Proteinkinasen in Inselzellen zu aktivieren (Harrison und Ashcroft 1982; Schubart und Fleischer 1982). Man spricht hier von Calcium-Calmodulin-abhängiger Proteinkinase-Aktivität. Diskutiert wurde in der Folge die Phosphorylierung der α- und ß-Untereinheiten des Tubulins durch eine Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase (Colca et al. 1983). Für die Polymerisation des Mikrotubulussystems scheint außerdem noch die Phosphorylierung von MAP's

= microtubule associated proteins) durch eine cAMP-ahängige Proteinkinase erforderlich zu sein (Sloboda 1975). Die polymerisierten Tubulus-Untereinheiten bilden als Mikrotubuli die Zellstrukturen aus, entlang derer sich die Sekretionsgranula gerichtet bewegen.

Dean (1975) vermutete, daß letztendlich ein lokaler Anstieg der Ca^{2+}-Konzentration an der Membraninnenseite eine Fusion der Granula mit der Membran ermöglicht.

1.1.2.3. Bedeutung von cAMP bei der Glucose-induzierten Insulinsekretion

a) Regulation des cAMP-Spiegels:

Die Vorstellung, daß cAMP in der pankreatischen B-Zelle als second messenger fungieren würde, kam wahrscheinlich zum ersten Mal auf, als Samols et al. (1965) berichteten, daß Glucagon die Insulinfreisetzung beim Menschen stimulieren konnte. 1967 wurden von Turtle und Kipnis erste cAMP-Messungen an Inseln durchgeführt, die eine Zunahme des cyclischen Nukleotides durch Glucagon und Theophyllin und eine Abnahme durch Adrenalin zeigten. Ein Anstieg der cAMP-Konzentration nach Glucosereiz wurde etwas später in Ratten- (Charles 1973, Grill 1976) und Mäuseinseln (Capito und Hedeskov 1974, Hellman et al. 1974a) festgestellt.

Cerasi und Luft (1972) äußerten nun als erste die Vermutung, daß Glucose an der B-Zellmembran in Interaktion mit einem spezifischen Rezeptor treten würde, was über eine Aktivierung der Adenylatcyclase zur vermehrten cAMP-Bildung und Insulinsekretion führen würde.

Von Charles et al. (1975) wurden zwar während der Glucose-induzierten Insulinsekretion erhöhte cAMP-Spiegel in den ersten 2-3 Minuten beobachtet, diese traten aber nicht auf, wenn Calcium im Extrazellulärraum fehlte (Charles 1975, Zawalich 1975). In der Folgezeit wurde keine direkte Stimulation der Adenylatcyclase in Inselhomogenaten durch Glucose gefunden (Howell 1973, Kuo 1973, Thams 1984). Nur eine Publikation berichtete von einer direkten Stimulation der Adenylatcyclase in Mäuseinselhomogenaten durch Glucose (Capito und Thams 1977), was aber später an Ratteninsel-fraktionen nicht bestätigt werden konnte (Thams et al. 1982).
Nachdem von Valverde et al. (1979) und Sharp (1980) eine Stimulation der Adenylatcyclase Langerhansscher Inseln durch Ca^{2+}-Calmodulin gezeigt werden konnte (Calcium allein hemmte die Adenylatcyclase), wurde vermutet, daß der Glucose-induzierte cAMP-Anstieg ein Sekundäreffekt ist, ausgelöst durch die erhöhte cytosolische Calciumkonzentration nach Glucosereiz und anschließende Kopplung von Calcium an sein Regulatorprotein.

b) cAMP als Modulator:

Auch der Teil der These von Cerasi und Luft (1972), daß cAMP nach dem Prinzip von Sutherland als second messenger und somit neben dem Glucosemetabolismus als "trigger" der Insulinsekretion fungieren würde, konnte nicht bestätigt werden.
Eine Beteiligung des cAMP bei der Glucose-induzierten Insulin-sekretion auf andere Weise war aber sehr wahrscheinlich, nachdem zwar in Abwesenheit stimulatorischer Glucosekonzentrationen keine bzw. nur eine geringe Sekretionssteigerung festgestellt werden konnte (Charles 1975, Sharp 1979), wenn cAMP vermehrt in der

Langerhansschen Insel vorlag, eine Glucose-induzierte Insulinsekretion aber durch erhöhte cAMP-Spiegel - Glucagon: Samols 1965; Isoprenalin, ACTH, TSH: Malaisse 1967; Coffein, Theophyllin, Isobutylmethylxanthin (IBMX): Burr 1970, Montague 1971; Forskolin: Ammon/Müller 1984c, Malaisse 1984a - in jedem Fall potenziert wurde.

Auch als eine direkte Wirkung von Choleratoxin, Glucagon und Forskolin auf die Adenylatcyclase Langerhansscher Inseln gesichert war, konnte bis auf eine Studie (Steinberg et al. 1984) kein Effekt dieser AC-Stimulatoren auf die Insulinsekretion bei substimulatorischer Glucosekonzentration ermittelt werden (Hellman 1974a, Wollheim 1974, Wiedenkeller 1983).

Aufgrund dieser Resultate wird dem cAMP bei der Glucose-induzierten Insulinsekretion seit einigen Jahren die Rolle eines positiven Modulators zugewiesen (Hedeskov 1980).

c) cAMP und Ionenfluxe:

1972 wurde erstmals von Brisson et al. die These entwickelt, daß cAMP Calcium aus intrazellulären Speichern mobilisiert. Diese Theorie wurde später durch Ca^{2+}-Efflux-Messungen erhärtet: Untersuchungen mit db-cAMP zeigten eine erhöhte Effluxrate dieses Kations (Gylfe und Hellman 1981, Henquin und Meissner 1984).

Studien zur Calciumakkumulation in Fraktionen von Insel-Mitochondrien und -mikrosomen (Howell/ Montague 1975, Sehlin 1976, Colca 1983) erbrachten allerdings widersprüchliche Resultate: Hier ist wohl noch eine Ausgrenzung der Resultate zu erwarten, die mit Xanthinderivaten erhalten wurden, da diese neben der Hemmung der cAMP-Phosphodiesterase noch eigene Wirkungen auf die intrazelluläre Calciumverteilung ausüben

(Täljedal et al. 1978). Somit scheint eine lange Zeit postulierte Wirkung von cAMP auf die intrazellulären Calciumspeicher der B-Zelle noch nicht gesichert (Henquin 1985).

Ein Effekt von cAMP auf den Calciuminflux wurde bisher abgelehnt (Henquin 1982 , Malaisse 1984). Wurden aber Messungen mit stimulatorischen Glucosekonzentrationen (7-10 mM) durchgeführt, konnten sowohl Forskolin als auch db-cAMP den Calciuminflux minimal verstärken (Henquin und Meissner 1983+1984). Aus Messungen einer gesteigerten elektrischen Aktivität in Mäuse-pankreas-B-Zellen nach Forskolin- oder db-cAMP-Behandlung wurde auf eine modulierende Wirkung von cAMP auf die Permeabilität von Calciumkanälen geschlossen (Henquin 1983). Diese Resultate werden allerdings noch kontrovers diskutiert (Malaisse 1984).

Aus neueren Untersuchungen intrazellulären freien Calciums mit der Quin-2-Technik in Inseln von ob/ob-Mäusen (Abrahamson 1984) oder RINm5F-Zellen (Wollheim 1984) geht hervor, daß weder Forskolin noch db-cAMP oder Theophyllin in der Lage waren, die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration zu erhöhen. Daraus zog Henquin (1985) die Schlussfolgerung, daß cAMP die Insulinsekretion eher dadurch potenziert, daß es den Sekretionsablauf gegenüber Calcium sensibilisiert, als daß cAMP die intrazelluläre Konzentration von Calcium erhöht. Ein verstärkter Ca^{2+}-Influx soll dabei durch einen beschleunigten Efflux kompensiert werden. Eine lokale Calciumionenzunahme in Zellmembrannähe würde nämlich nicht durch die Quin-2-Technik erfaßt werden können.

d) cAMP und Glucosemetabolimus:

Eine erleichterte Metabolisierung von Nährstoffen in der Inselzelle unter dem Einfluß von cAMP konnte in zahlreichen Untersuchungen nicht beobachtet werden (Malaisse 1984). Ein Effekt von db-cAMP auf Glucoseaufnahme, -utilisation und -oxidation wurde abgelehnt (Malaisse 1974, Sener/Malaisse 1978).

e) cAMP und Enzymaktivitäten:

Eine zentrale Rolle bei der Übermittlung von extrazellulären Signalen auf intrazellulär sekretorische Vorgänge kommt den Proteinkinasen zu (Harrison 1984). Neben der Entdeckung einer Reihe derartiger Enzyme in der pankreatischen B-Zelle - "myosin light chain kinase": Harrison 1982, MacDonald 1982; Ca^{2+}-Calmodulin abhängige Proteinkinase: Colca 1983, Schubart 1980; Ca^{2+}-phospholipid abhängige Proteinkinase: Lord 1984, Tanigawa 1982 - wurden auch zwei cAMP-abhängige Proteinkinasen (Typ I und Typ II) nachgewiesen und charakterisiert (Montague/Howell 1972, Sudgen/Ashcroft 1979).

Das Zusammenwirken dieser Enzyme ist in einem Modell zum Mechanismus der Insulinsekretion in Abb. 1.5. zusammengefaßt.

Die zentrale Rolle der Sekretionsauslösung wird hier einer Ca^{2+}-Calmodulin abhängigen Proteinkinase zugeschrieben, während Phospholipid- und cAMP-abhängige Proteinkinasen eine potenzierende Funktion haben sollen. Ein Einfluß der Proteinphosphorylierung auf Ionenkanäle wurde 1983 von Levitan diskutiert.

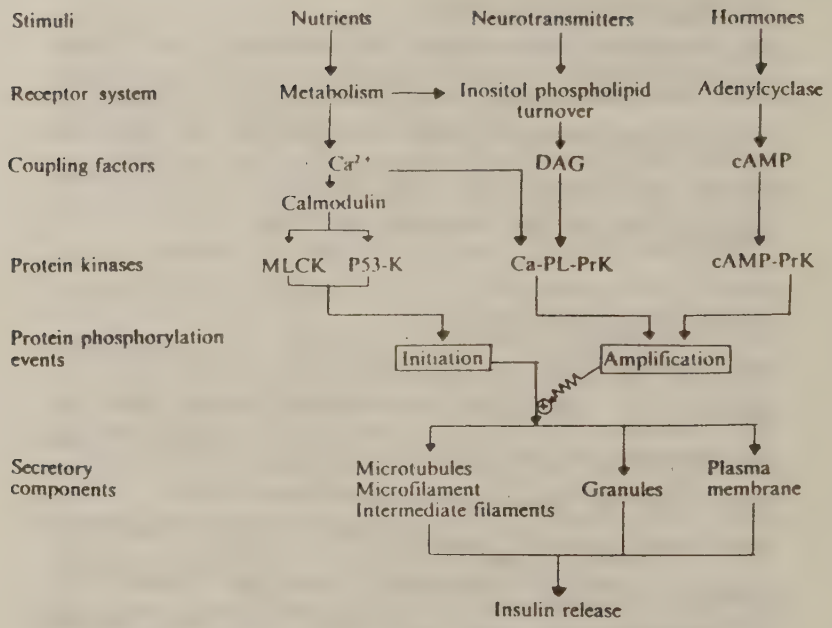

Abb. 1.5.: Beteiligung der Proteinphosphorylierung bei der Regulation der Insulinsekretion (nach Harrison 1984).

1.1.2.4. Bedeutung von Thiolen und Reduktionsäquivalenten für die Insulinsekretion:

Untersuchungen von Ammon und Steinke (1972) wiesen erstmals auf die Bedeutung von reduzierten Pyridinnukleotiden für die Insulinsekretion hin. Wie aus Abb. 1.3. deutlich wird, geht eine Verstoffwechselung der Glucose mit einer vermehrten Bildung von reduzierten Pyridinnukleotiden einher. Dabei steigt der cytosolische NADPH/NADP-Quotient unter Glucosereiz stärker an als der NADH/NAD-Quotient (Ashcroft und Christie 1979). Hedeskov et al. (1983) wiesen dem NADH/NAD-Quotienten überhaupt keine

Bedeutung bei der Glucose-induzierten Insulinsekretion zu.

NADPH entsteht bei der Glucosemetabolisierung im Pentosephosphatshunt (PPS). Ein dosisabhängiger Anstieg der PPS-Aktivität (Verspohl und Ammon 1979) und des NADPH/NADP-Quotienten (Ammon et al. 1979 , 1980a) nach Glucosereiz wurde in Langerhansschen Inseln der Ratte nachgewiesen.

Wie von Agren (1978) gezeigt wurde, ist NADPH für die Glutathionreduktase pankreatischer Inseln von ob/ob-Mäusen das bevorzugte Coenzym. Daß ein erhöhter NADPH/NADP-Quotient in einem Anstieg des GSH/GSSG-Quotienten resultiert, wurde 1980 (a) von Ammon et al. dokumentiert.

Abb. 1.6. zeigt schematisch den Mechanismus, mit dem intra- und extrazelluläre Redoxsysteme möglicherweise modulierend in den Ablauf der Insulinsekretion eingreifen: Über den Nährstoffmetabolismus vermehrt gebildetes NADPH führt zum Anstieg von intrazellulärem GSH, das wiederum kritische Membranthiole im reduzierten Status zu halten vermag. Die Fähigkeit, auf kritische Proteinthiole der Zellmembran (evtl. über eine Dehydrogenase) reduzierend zu wirken, wird auch permeablen und nicht permeablen Cysteinderivaten incl. Glutathion zugeschrieben (Ammon 1984b).

Eine vergleichbare Regulation des Redoxzustandes von Memranthiolen durch das intrazelluläre GSH/GSSG-System wurde bereits in Leberzellen (Rink 1974, Isaacs 1977) und Erythrocyten (Kosower 1982) beschrieben.

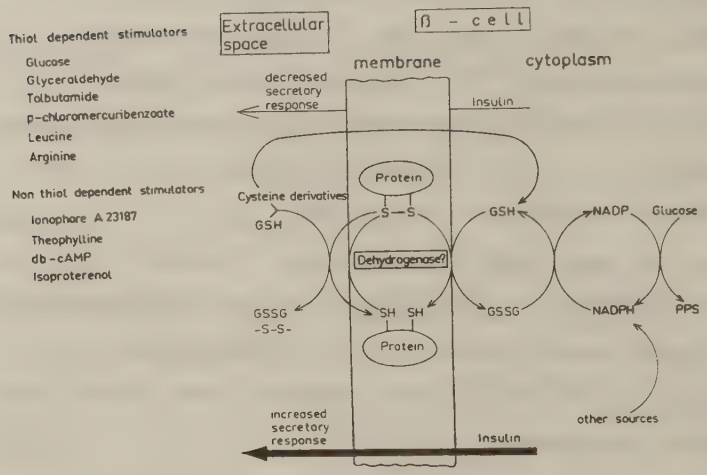

Abb. 1.6.: Thiolabhängige und nicht thiolabhängige Stimulatoren der Insulinsekretion. Hypothetische Rolle des Redoxstatus von intra- und extrazellulärem Glutathion (GSH) und/oder Cysteinderivaten bei der Regulation der Insulinfreisetzung (nach Ammon 1985).

In diesem Stadium ist die B-Zelle sensitiver gegenüber bestimmten "triggern" der Insulinsekretion, umgekehrt wird eine verminderte Ansprechbarkeit auf Stimulatoren der Insulinsekretion beobachtet, wenn die Membranthiole in einem etwas oxidierteren Status vorliegen.

Von Ammon et al. (1984a) wurde eine Unterteilung in thiolabhängige und nicht thiolabhängige Stimulatoren der Insulinsekretion getroffen (Abb. 1.6.): Eine durch pCMB, Glucose oder Tolbutamid induzierte Insulinsekretion konnte durch das Thioloxidans Diamid gehemmt werden, während die Zufuhr exogenen Glutathions die Wirkung von Glucose und Tolbutamid zu steigern

vermochte. Eine Insulinsekretion, die nach der Stimulation mit Glucagon, Aminophyllin und Isoproterenol resultierte, war dagegen von einer Thioloxidation mittels Diamid oder vom Zusatz exogenen Glutathions unbeeinflußt. Untersuchungen mit den Thioloxidantien Methylenblau, t-BHP und Diamid (Ammon et al. 1979 + 1980b), sowie dem membrangängigen DIP (Diazadicarbonsäure-bis-N'-methylpiperazid) und seinem nicht permeablen Salz (Ammon 1983) führten zu der Annahme, daß Thiolreagentien, die nicht in die Zelle eindringen, die Calciumaufnahme steigern und somit zur Insulinsekretion führen, während intrazellulär vorliegende Thioloxidantien die Glucose-induzierte Insulinsekretion hemmen, indem sie den Calcium-Influx blockieren.

Thiolabhängig scheint insbesondere die Wirkung von Substanzen zu sein, die zu einer Öffnung voltabhängiger Calciumkanäle führen. Dagegen werden jene Substanzen als thiolunabhängig angesehen, die die Insulinsekretion stimulieren, indem sie entweder Calcium auf ionophoretischem Wege in die Zelle schleusen (Ionophor A 23187, Glibenclamid), oder aber das cAMP-System beeinflussen (Isoprenalin, Glucagon, db-cAMP bzw. Theophyllin) (Ammon 1984a). Eine direkte Beteiligung von SH-Gruppen bei der Regulation des Adenylatcyclase-Systems konnte aber keinesfalls ausgeschlossen werden, wie unter 1.1.3. erläutert wird.

1.1.3. Adenylatcyclase

1.1.3.1. Aufbau der Adenylatcyclase

Nach der Entdeckung eines "heat resistant factors" durch Sutherland und Rall (1957) und dessen Identifikation als cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP), wurde dessen immense Bedeutung als "second messenger" bald erkannt (Sutherland und Robison 1966).

Noch vor wenigen Jahren hatte das in Abb. 1.7. dargestellte Modell der Adenylatcyclase Gültigkeit.

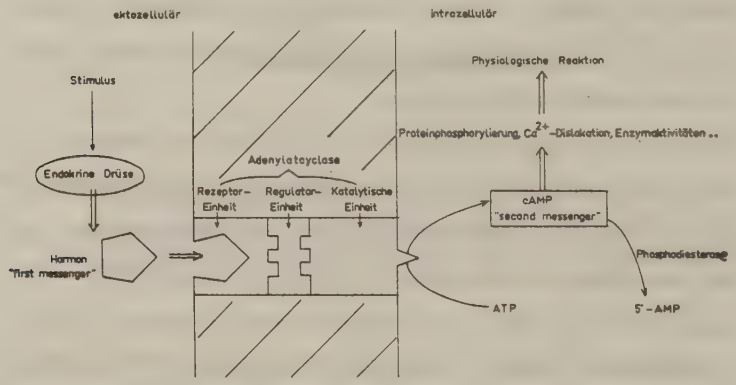

Abb. 1.7.: Stark vereinfachtes Modell zur Funktion der Adenylatcyclase.

Rasch wies man die Membranständigkeit dieses Enzymsystems nach, was auch für Langerhanssche Inseln der Ratte gezeigt wurde (Howell 1972). Die Funktion dieses fast ubiquitär in Eukaryontengewebe vorliegenden Enzyms wurde folgendermaßen diskutiert:

Das auf einen Stimulus aus der endokrinen Drüse freigesetzte Hormon ("first messenger") gelangt über den Blutweg an die Effektorzelle und bindet an einen spezifischen Rezeptor der

Adenylatcyclase an der Zellmembranaußenseite. Über eine nicht genauer definierte Regulatoreinheit wird die katalytische Einheit aktiviert, die an der Zellmembraninnenseite liegt. Aus ATP wird nun das cAMP ("second messenger") gebildet, das zu einer Vielzahl von intrazellulären Veränderungen führt, wie z.B. Calcium-Dislokationen, Proteinphosphorylierungen und andere veränderte Enzymaktivitäten.
Dadurch erfolgt die physiologische Reaktion der Zelle. Der Abbau des cAMP erfolgt sehr rasch durch das Enzym Phosphodiesterase (PDE), von dem in der Pankreasinsel zwei Formen existieren: Eine "low K_m-PDE" und eine "high K_m-PDE" (Bowen 1972, Goldfine 1971). Somit stellt auch in der Langerhansschen Insel der Zellgehalt an cAMP ein Gleichgewicht zwischen Synthese, Abbau und Abgabe in den Extrazellulärraum dar (Malaisse 1984).

Weitergehende Forschungsanstrengungen der letzten Jahre ermöglichen heute einen genaueren Blick auf den Aufbau und die Funktion des AC-Systems (Rodbell 1980, Ross 1980, Limbird 1981, Aurbach 1982). Nach einem Schema von Stiles (1984) entstand die Abb. 1.8., in der das Zusammenspiel der verschiedenen Teile des AC-Systems dargestellt ist. Es ist dies das imaginäre Modell einer ubiquitären Adenylatcyclase mit einer exemplarischen Auswahl von Substanzen, die Einfluß auf die AC ausüben.

ADENYLATE CYCLASE SYSTEM

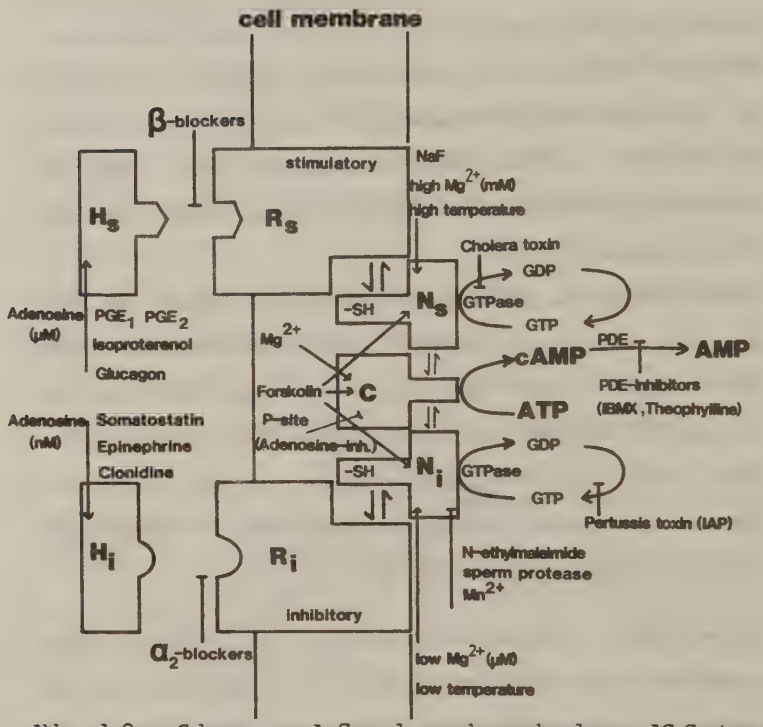

Abb. 1.8.: Schema zum Aufbau des membrangebundenen AC-Systems (mod. nach Stiles 1984). Eine beispielhafte Reihe von einflußnehmenden Substanzen mit ihren Angriffspunkten ist aufgeführt.

Abk.: s = stimulatorisch, i = inhibitorisch, C = katalytische Einheit, N = GTP-bindendes Regulatorprotein, H = Hormon, Agonist, R = Rezeptor.

Zunächst kann eine Unterteilung der Adenylatcyclase in drei funktionelle Komponenten vorgenommen werden:

- mindestens 2 Rezeptorproteine (R) an der Zellmembranaußenseite, die spezifische Bindungstellen für stimulatorische oder inhibitorische Hormone bzw. Neurotransmitter aufweisen.

- 2 Nukleotid (GTP)-bindende Regulatorproteine (N), welche die Information des Rezeptor-gebundenen Liganden an die katalytische Einheit übermitteln.

- eine katalytische Einheit (C), welche die von den N-Proteinen erhaltene Information in verstärkte oder verminderte Bildung von cAMP aus Mg-ATP umsetzt.

a) Rezeptoren der Adenylatcyclase:

Limbird/Lefkowitz (1977) und Haga et al. (1977) lieferten die ersten Nachweise, daß die Rezeptoren der AC individuelle Proteine darstellen, die getrennt von anderen Komponenten der Zellmembran vorliegen. Rodbell (1980), Birnbaumer (1985) und Bockaert (1986) faßten eine Reihe verschiedener stimulatorischer Rezeptoren zusammen:
ß-adrenerge, Glucagon-, ACTH-, Vasopressin (V_2)-, Adenosin (R_a)-, Prostaglandin-, Dopamin (D_1)- und 5-Hydroxytryptamin ($5HT_x$)-Rezeptoren wurden an den verschiedensten Geweben nachgewiesen.

Die Zusammenstellung inhibitorischer Rezeptoren der AC sieht laut Jakobs (1984), Birnbaumer (1985), Asano (1985) und Bockaert (1986) folgendermaßen aus:
α_2-adrenerge, cholinerge (muscarinische), Somatostatin-, Opiat-, Adenosin (R_i)-, Prostaglandin-, Dopamin (D_2)- und 5-Hydroxytryptamin ($5HT_1$)-Rezeptoren wurden ebenfalls an diversen Zellpräparationen gefunden.

Diese Vielzahl verschiedener Rezeptoren bedingt die Spezifität der AC unterschiedlichster Effektorzellen. Trotz nahezu identischem Aubau können die AC-Systeme also ganz individuell

geregelt werden. Ein Teil der Rezeptoren, wie z.B. die ß- und α_2-adrenergen Bindungsstellen, scheint aber in den meisten AC-Systemen vorzuliegen.

b) Nukleotidbindende Regulatorproteine:

Die beiden GTP-bindenden Regulatorproteine der AC werden in stimulatorisches N-Protein (N_s) und inhibitorisches N-Protein (N_i) unterteilt. D.h. N_s vermittelt die Stimulation von Hormonen, während N_i die Inhibition hemmender Liganden überträgt.
Die Bezeichnung N (nucleotide binding)- oder G (guanine nucleotide binding)-Protein entstand, als Ross/Gilman (1980) beobachteten, daß die Hormon-induzierte AC-Stimulation streng GTP-abhängig verlief.
Houslay (1984) identifizierte und charakterisierte die beiden N-Proteine. Sie wurden als Hetero-Trimere erkannt, d.h. sie bestehen aus jeweils 3 Untereinheiten mit folgenden Molekulargewichten:
Ein α_s-Protein mit 42 kDa (Mitrius 1985) bzw. 45 kDa (Owens 1985), ein $ß_s$-Protein mit 35 kDa (Northup 1983) und ein γ_s-Protein von ca. 5 kDa (Owens 1985) bis 10 kDa (Asano 1985) sind die Komponenten von N_s.
Sehr ähnlich sind die Verhältnisse bei N_i:
Die $ß_i$- und γ_i-Proteine sollen dieselben Molekulargewichte wie die entsprechenden Untereinheiten von N_s aufweisen (Asano 1985). Manning et al. (1983) vermuteten sogar, daß $ß_s$ und $ß_i$ identisch seien. Für α_i wurde ein Molekulargewicht von 41 kDa festgestellt (Codina 1984, Katada 1984). Im Strukturaufbau soll eine starke Ähnlichkeit zwischen α_s und α_i bestehen (Manning 1983).

Unterschiedliche Eigenschaften von N_i und N_s wurden von Jakobs (1984) zusammengefaßt:

- Zunächst war ein unterschiedlicher Mg^{2+}-Bedarf für N_s (hoch: mM-Bereich) und N_i (niedrig: uM-Bereich) festgestellt worden.
- Während die optimale Temperatur für die Stimulation der AC hoch (37 °C) liegt, genügen für eine N_i-vermittelte Hemmung niedrigere Temperaturen (ca. 25 °C).
- Natriumfluorid führt in millimolaren Konzentrationen über einen direkten Angriff an N_s zu einer irreversiblen Stimulation der AC (Ross und Gilman 1980).
- Die Wirkungen der bakteriellen Toxine Choleratoxin auf N_s und Pertussistoxin (IAP) auf N_i werden unter 1.1.3.2. beschrieben.
- Während Mn^{2+} auf die AC-Stimulation keinen Einfluß hatte, ließ sich eine Hormon-induzierte Hemmung mit Mn^{2+} (>1 mM) aufheben (Cooper 1982, Jakobs 1981).
- Neben der Blockade von N_i durch IAP und Mangan wird verschiedenen Proteasen wie Trypsin, Chymotrypsin und Spermzellen-Protease eine ähnliche Spezifität nachgesagt (Ferry 1982, Stiles 1982).
- Über eine Inaktivierung von N_i durch niedrige Konzentrationen von NEM berichteten Harden (1982) und Jakobs (1982).

c) Katalytische Einheit:

Die katalytische Einheit (C) ist ein Glykoprotein, das seine Wirkung zur Membraninnenseite entfaltet, aber möglicherweise bis zur Zellaußenseite hinragt (Bockaert 1986). Nach Stimulation durch α_s-GTP produziert das Enzym cAMP. Als Substrat dient Mg-

ATP (Ross 1980).

Die zentrale Rolle bei der Regulation der katalytischen Einheit spielt das Magnesiumion (Cech 1980), für das Bindungsstellen an N_S (Iyengar 1982) und C (Cech 1980) nachgewiesen wurden. Während N_S die Affinität von C gegenüber Mg^{2+}-Ionen erhöht und damit die katalytische Einheit stimuliert, hat N_i den gegenteiligen Effekt und hemmt dadurch die Cyclase (Jakobs 1984, Bockaert 1984).

Mg^{2+}-Ionen können durch andere zweiwertige Kationen, wie z.B. Mn^{2+}-Ionen, ersetzt werden (Howlett 1979).

Auch Ca^{2+}-Ionen interagieren mit der katalytischen Einheit: Ca-ATP kann eine kompetitive Verdrängung von Mg-ATP bewirken, was in einer Hemmung des Enzyms resultiert (Cech 1980). In Anwesenheit seines Regulatorproteins Calmodulin stimuliert Calcium jedoch die AC, wahrscheinlich über einen direkten Angriff an der katalytischen Einheit (Salter 1981). Entsprechende Resultate mit Calcium und Calmodulin wurden von Valverde (1979) und Sharp (1980) bei Langerhansschen Inseln erhalten.

Ein weiterer Angriff von Adenosin, der in einer nicht N_i-vermittelten Hemmung resultiert, soll an einer "P-site" von C erfolgen.

Der Entdeckung und Isolation (Bhat et al. 1977) des bisher bedeutendsten Stimulators der Adenylatcyclase (Seamon 1981, Darfler 1982), des Forskolins, folgte bald die Ermittlung der katalytischen Einheit als Hauptangriffsort (Ross 1982, Seamon 1981a): Forskolin führte in cyc^--Varianten von S49 Lymphoma-Zellen, deren AC-System kein N_S-Protein aufweist, trotzdem zu einer außerordentlich starken Zunahme der AC-Aktivität, wie in nahezu allen anderen Geweben auch. Dieses Diterpen aus der in Indien heimischen Pflanze coleus forskohlii verstärkt aber auch

die Wirkung von N_s auf die katalytische Einheit, wie Seamon und Daly 1982 zeigten.

1.1.3.2. Regulationsmechanismen im AC-System

Als Abb. 1.9. ist ein Schema nach Mitrius und Prichard (1985) für den Ablauf der Stimulation und Inhibition der Adenylatcyclase dargestellt:

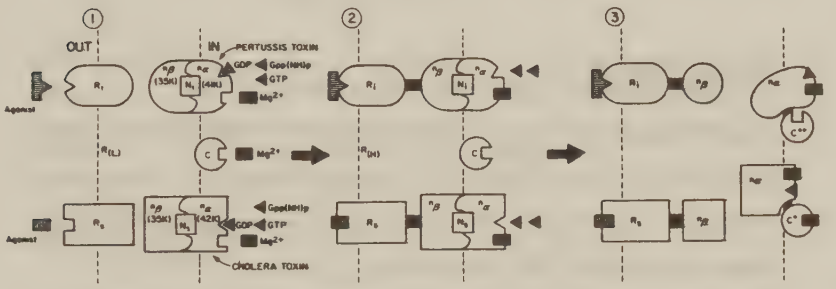

Abb. 1.9.: Schema eines möglichen Mechanismus der Aktivierung und Hemmung der Adenylatcyclase durch Agonisten (nach Mitrius und Prichard 1985).

Abk.: s = stimulatorisch, i = inhibitorisch, C = katalytische Einheit, N = GTP-bindende Regulatorproteine, n_β und n_α = Untereinheiten der N-Proteine, R = Rezeptor, $R_{(L)}$ = "low affinity"-Zustand des Rezeptors, $R_{(H)}$ = "high affinity"-Zustand des Rezeptors.

Das cAMP-synthetisierende Enzym (katalytische Einheit C) wird von 2 Seiten geregelt, d.h. es unterliegt stimulatorischer und inhibitorischer Beeinflußung (Rodbell 1980). Obwohl die stimulatorischen und inhibitorischen Hormonsignale in einem gemeinsamen Enzym zusammenlaufen, werden sie von zwei verschiedenen, trimeren, GTP-abhängigen Regulatorproteinen (N_s und N_i) übermittelt.

Nach Bindung der Agonisten (H_s oder H_i) an ihren spezifischen Rezeptor (R_s oder R_i), der sich im "low affinity"-Zustand befindet, an der Zellmembranaußenseite, koppelt dieser Hormon-Rezeptor-Komplex (H_sR_s bzw. H_iR_i) an das N-Protein (N_s oder N_i) unter Entstehung eines Dreifach-Komplexes ($H_sR_sN_s$ bzw. $H_iR_iN_i$) (Limbird und Lefkowitz 1978). Bei diesem Vorgang wurde GDP von N_s bzw. N_i abgespalten und Mg^{2+} gebunden. Nun befindet sich der Rezeptor in der "high affinity"-Form.

a) Stimulation:

Im inaktiven Zustand des N_s-Proteins ist GDP an α_s gebunden. Nach Aktivierung durch einen stimulatorischen Liganden erfolgt ein Austausch von GDP durch GTP. Damit geht in Anwesenheit von Mg^{2+}-Ionen N_s in den aktiven Zustand über.

Nach Dissoziation des aktiven N_s-Proteins in $\beta\gamma_s$- und α_s-Untereinheiten findet eine Kopplung von α_s-GTP an C statt (Abb. 1.9.), das dadurch aktiviert wird (Northup 1982).

Die α-Komponenten besitzen zudem eine GTPase-Aktivität, die dafür sorgt, daß GTP zu GDP hydrolisiert wird, wodurch α- und $\beta\gamma$-Untereinheit aneinander koppeln und der inaktive Ausgangszustand wieder erreicht wird. Dieser "GTPase-cycle" wurde erstmals von Cassel und Selinger 1977 für N_s beschrieben, soll nach Jakobs (1984) aber auch für N_i gelten.

Schematisch ist der Zyklus, den N-Proteine bei der Aktivierung und Inaktivierung durchlaufen, in Abb. 1.10. dargestellt.

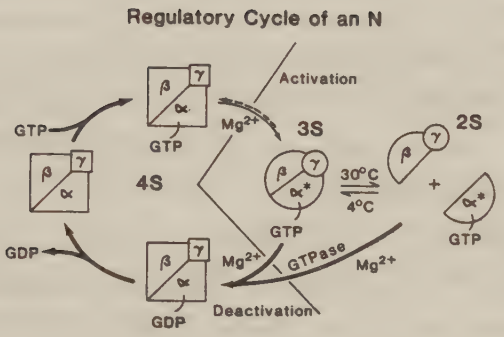

Abb. 1.10.: Zyklus eines N-Proteins zwischen aktivem und nicht aktivem Zustand unter dem Einfluß von GTP und Mg^{2+}.

Abk.: N = GTP-bindendes Regulatorprotein, α^*-GTP = aktive Untereinheit, ß + γ = Untereinheiten des N-Proteins.

b) Inhibition:

Ein vorgeschlagener Mechanismus besagt, daß die aktive α_i-Untereinheit ebenso wie α_s entweder direkt an C koppelt (Codina 1983) oder kompetitiv die Bindung von α_s an C hemmt (Abb. 1.9.); dadurch wäre die Enzymaktivität ebenfalls gehemmt.

Ein anderer Mechanismus wäre, daß die ßγ-Untereinheit von N_i freigesetzt wird und an das aktive α_s bindet, das auf diesem Wege inaktiviert wird. Unter diesem Gesichtspunkt findet eine direkte Hemmung der katalytischen Einheit durch α_i nicht statt oder ist relativ unbedeutend (Owens 1985). Dieser Mechanismus wird in der letzten Zeit meist favorisiert. Hinweis darauf sind Befunde, daß die gereinigte ßγ-Untereinheit die AC-Aktivität in Membranpräparationen aus Gehirn, Thrombozyten (Bockaert 1986) und Leber (Katada 1984) hemmt, während isoliertes α_i sogar die Adenylatcyclase zu stimulieren vermag (Katada 1984).

Die Untersuchung des AC-Komplexes konnte durch die Verwendung zweier bakterieller Toxine erleichert werden: Choleratoxin (CT) stimuliert die cAMP-Produktion indem es die α_s-Untereinheit ADP-ribosyliert (Cassel 1977; Murayama 1983). Diese kovalente Modifikation hemmt die GTPase-Aktivität von α_s und verlängert somit das stimulatorische Signal.

Pertussis-Toxin (=IAP, "islet activating protein") dagegen führt durch spezifische ADP-Ribosylierung von α_i zur Stimulation der AC. Diese Modifikation (mit kovalent gebundenem ADP) hemmt ebenfalls die GTPase-Aktivität von α_i, vermutlich indem der $\beta\gamma$-Komplex von N_i stabilisiert wird (Murayama 1983, Katada 1984) und damit inaktiv bleibt.

Der Name "islet activating protein" kam dadurch zustande, daß die stimulatorische Wirkung auf cAMP-Spiegel erstmals an der Langerhansschen Insel festgestellt wurde (Yajima 1978).

Bei der Aktivierung eines N-Proteins bindet GTP an eine von Gill (1983) vorgeschlagene "S-site" auf α_s, dasselbe soll für α_i gelten (Owens 1985). Diese "S-site" muß von GTP besetzt sein, um eine ADP-Ribosylierung einer "N-site" auf α_s durch Choleratoxin zu ermöglichen (Gill 1983). Der gleiche Mechanismus wird von Owens et al. (1985) für Pertussis-Toxin an α_i vorgeschlagen.

Während zunächst eine vollständige Substratspezifität dieser Toxine gegeben schien, zeigen neuere Untersuchungen, daß dieselben Proteine in Adipocyten sowohl von IAP als auch von Choleratoxin ADP-ribosyliert werden können (Owens 1985).

1.1.3.3. Bedeutung von Thiolen bei der Regulation der AC:

Zahlreiche Experimente der letzten Jahre lassen vermuten, daß kritische Thiolgruppen auch bei der Regulation der AC von entscheidender Bedeutung sind.

Oye und Sutherland (1966) konnten als Erste eine Abnahme der basalen AC-Aktivität in Erythrocyten nach Vorbehandlung mit Thioloxidantien feststellen, die durch Mercaptoethanol, einem Thiolreduktans, aufgehoben wurde.

Untersuchungen mit Quecksilberreagentien, z.B. p-Chloromercuribenzoat (pCMB) und $HgCl_2$, die mit SH-Gruppen Mercaptide bilden können, und Thioloxidantien wie N-Bromosuccinimid, führten Mukherjee (1977,1979) zu dem Schluß, daß die AC-Aktivität durch Oxidations-Reduktions-Reaktionen reguliert wird. Er schloß weiter, daß die Sensitivität der AC gegenüber hormonalen Stimuli eng mit dem intrazellulären Redoxstatus und dem reduzierten GSH-Spiegel verknüpft ist (Mukherjee 1980).

Auch die Befunde von Ozawa (1979), daß das Thioloxidans Diamid die AC-Aktivität von Schilddrüsenmembranen senkte und das Thiolreduktans DTT die basale AC-Aktivität etwas erhöhte, bestärkten die Theorie, daß SH-Gruppen der aktivierten katalytischen Einheit im reduzierten Zustand vorliegen sollten.

Aber auch das stimulierte Enzym wird durch Thioloxidation bzw. -blockade in seiner Aktivität beeinträchtigt. Schramm et al. (1970) verwendeten NaF als Stimulus der Adenylatcyclase, Storm und Dolginow (1973) setzten Glucagon ein.

Untersuchungen des Basalzustandes und des stimulierten Enzyms unter dem Einfluß von Thioloxidantien wurden von Drummond (1981) durchgeführt. Durch das Thioloxidans p-Aminophenolarsenoxid nahm

die Basalaktivität deutlich ab. Drummond vermutete daraufhin vicinale Thiole auf der katalytischen Einheit.

Das durch NaF bzw. GppNHp stimulierte Enzym war dagegen weniger leicht durch Thioloxidantien zu hemmen. Dies ließ die Schlußfolgerung zu, daß eine über N_s ablaufende Stimulation möglicherweise reaktive Thiole der katalytischen Einheit vor Oxidation schützt bzw. diese direkt an der Bindung von N_s und C beteiligt sind. Das bedeutet, daß Thiole vermutlich nicht nur entscheidend für die katalytische Aktivität sind, sondern auch an der Assoziation der stimulatorischen Regulatoreinheit und der katalytischen Einheit mitwirken.

Untersuchungen mit Quecksilberverbindungen, DTT, NaF und Choleratoxin identifizierten Thiolgruppen auf N_s als Hauptangriffsort dieser Hg-Reagentien (Lin et al. 1980).

Auch scheint die Reaktion zwischen Rezeptor und Hormonen durch Thioloxidantien beeinflußt zu werden, wie Tomasi (1970) und Czech (1974) anhand von Glucagon-, Adrenalin- und Insulinbindungsstudien unter dem Einfluß u.a. von NEM feststellten. Dagegen stimulierte Diamid eindeutig die Bindung von TSH an Schilddrüsenmembranen, während DTT die Affinität senkte (Ozawa 1979).

Korner et al. (1982) folgerten aus ihren Ergebnissen, daß die übliche Kopplung des Hormon-Rezeptor-Komplexes an N_s eine Konformationsänderung und einen vorübergehenden Einschluß des Hormones mit sich bringt. GTP löst diese enge Verbindung wieder auf, während Thiolreagentien den Dreierkomplex Hormon-Rezeptor-N-Protein stabilisieren.

Wie Vauquelin et al. (1980) anhand von NEM zeigten, nimmt dadurch die Anzahl der verfügbaren Rezeptorbindungsstellen rasch ab. Der

alleinige Zusatz des Hormones (Isoproterenol) oder des Thioloxidans (NEM) führte zu keiner Rezeptor-Inaktivierung. Zusatz von GTP konnte diesen Effekt verhindern. Die Schlußfolgerung daraus war, daß der Rezeptor eine versteckte SH-Gruppe besitzt, die im Hormon-Rezeptor-N-Protein-Komplex freigelegt und somit dem Angriff von NEM ausgesetzt wird.

Während all diese Untersuchungen mit NEM-Konzentrationen von 0.5 mM und mehr durchgeführt wurden, setzte Jakobs (1982) Konzentrationen ab 0.1 mM ein. Diese geringen Konzentrationen von NEM waren in der Lage, eine α_2-adrenerge Hemmung der AC über N_i abzuschwächen bzw. aufzuheben. Auch eine GTP-induzierte Hemmung der AC in Hamsteradipocyten wurde nach NEM-Vorbehandlung nicht mehr beobachtet. Da auch eine Abnahme von inhibitorischen Rezeptorbindungsstellen durch NEM nicht festgestellt werden konnte, wurde N_i als Angriffsort für die Thioloxidation vermutet. Spätere Untersuchungen konnten diese Annahme unterstützen (Aktories 1982a, Awad/Jakobs 1983).

Insgesamt ergibt sich der Eindruck, daß kritische Thiole bei der Regulation der AC eine bedeutende Rolle spielen. SH-Gruppen in Verbindung mit R_s, N_s, C, N_i und an den Verknüpfungsstellen zwischen R_s und N_s bzw. N_s und C wurden postuliert. Eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Thioloxidantien (NEM) wird insbesondere bei N_i deutlich (Jakobs 1984).

Obwohl schon eine Reihe von Thiolreagentien hinsichtlich ihres Effektes auf cAMP-Spiegel Langerhansscher Inseln untersucht wurde (Hellman 1974b, Ammon/Heinzl 1982), liegen kaum entsprechende Messungen der AC-Aktivität unter dem Aspekt der Thiolabhängigkeit

vor. Capito et al. (1977) konnten lediglich einen direkten Effekt von NADPH auf die AC-Aktivität Langerhansscher Inseln nicht ermitteln, während das Stimulans der Insulinsekretion pCMB, das in der intakten Insel cAMP-Spiegel zu erhöhen vermochte (Ammon 1982), die AC-Aktivität deutlich verminderte. Allerdings muß festgestellt werden, daß pCMB die Zellmembran wohl kaum durchdringen kann (Bloom 1972).

Auch Mukherjee et al. (1984) untersuchten die Bedeutung von Thiolen und Redoxäquivalenten für intrazelluläre cAMP-Spiegel und die AC-Aktivität pankreatischer Inseln. Die Behandlung intakter Inseln z.B. mit Diamid (0.5 mM) resultierte bei niedriger Glucose (0.05 mM) in einer Abnahme der basalen und stimulierten cAMP-Spiegel. Normale cAMP-Gehaltswerte konnten aber durch Glucose in der Schwellendosis (5.5 mM) wiederhergestellt werden.

Messungen der AC-Aktivität zeigten eine Abnahme sowohl der basalen als auch der stimulierten (Glucagon, Isoproterenol, NaF) Enzymaktivität durch Oxidantien. Der Ausgangszustand konnte durch den Zusatz von DTT oder Monothiolen wie GSH im molaren Überschuß wiederhergestellt werden.

Entsprechend den Untersuchungen an anderen Geweben (Mukherjee 1980) folgerten die Autoren,

- daß die Inselzell-Adenylatcyclase aktiv ist, wenn katalytische SH-Gruppen reduziert vorliegen,
- daß der Redoxstatus von intrazellulärem GSH und NAD(P)H die Empfindlichkeit der Adenylatcyclase bestimmt,
- daß neben den katalytischen SH-Gruppen zusätzliche Thiole an einer Regulatorkomponente existieren.

1.1.4. Second messenger Systeme: Der Phosphoinositol-Metabolismus

Neben der Neurotransmitter- bzw. Hormonsignal-Übermittlung in die Effektorzelle durch das AC-System oder über Calcium trat in den letzten Jahren der Metabolismus von Membraninositiden vermehrt in den Blickpunkt des Interesses. Diese "second messenger" Systeme (wie z.B. auch die Guanylatcyclase) sind heute nicht mehr isoliert zu betrachten, sondern übernehmen bei der Signalübermittlung verschiedene Funktionen in der Zelle und stehen darüberhinaus in einem engen Wechselspiel untereinander. Lokalisation, Aufbau und einige Verknüpfungen der beiden second messenger Systeme der Adenylatcyclase und des Phospholipidstoffwechsels sind in Abb. 1.11. schematisch dargestellt (Anderson 1985).

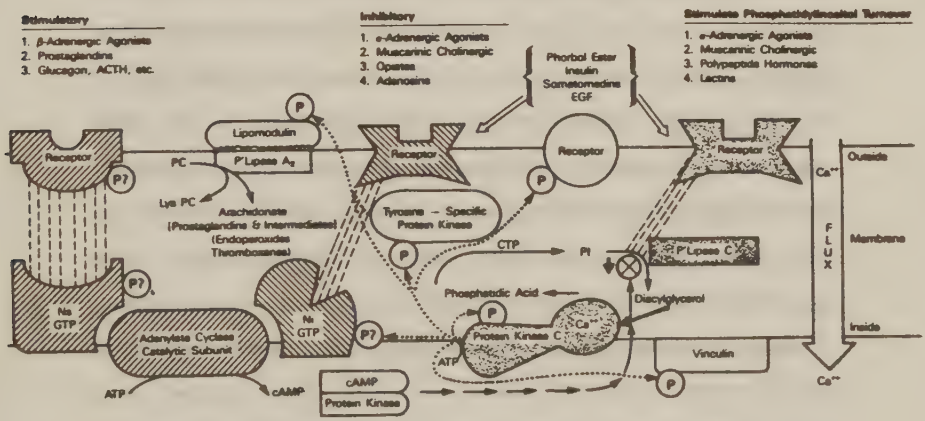

Abb. 1.11.: Schema denkbarer Mechanismen für die reziproke Regulation der AC-Aktivität und des Phospholipid-Stoffwechsels (nach Anderson 1985). Die unter 1.1.3. definierten Untereinheiten der AC sind schraffiert dargestellt, während Rezeptoren und Enzyme des Phosphoinositol-Turnovers gepunktet hervorgehoben sind.

Abkürzungen: N_s und N_i: GTP-bindende Regulatorproteine, CTP: Cytidintriphosphat, PC: Phosphatidylcholin, PI: Phosphotidylinositol.

Die Schlüsselreaktion bei der Reizübertragung durch Phospholipide scheint die rezeptorvermittelte Hydrolyse von Phosphoinositol-4,5-diphosphat durch das Enzym Phospholipase C in Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP_3) zu sein. Beide sollen (vergleichbar mit cAMP) als second messenger fungieren.

IP_3 scheint über die Mobilisierung von intrazellulärem Calcium zu wirken, während DAG die Proteinphosphorylierung inbesondere über die Proteinkinase C stimuliert (Berridge 1984), und damit synergistisch zu IP_3 wirkt. Diese Proteinkinase soll u.a. an der Aktivierung der Phospholipase A_2 beteiligt sein, die den Arachidonsäuremetabolismus in Gang bringt, in dessen Verlauf Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene entstehen.

Eine direkte Interaktion der Proteinkinase C mit dem AC-System konnte in jüngsten Studien anhand von Phorbolestern (z.B. TPA), die in der Lage sind, die Proteinkinase C direkt zu aktivieren, gezeigt werden. Jakobs et al. (1985) wiesen nach, daß TPA in Thrombozytenfraktionen N_i-vermittelte Wirkungen auf die AC stark abschwächt. Diese Befunde wurden mit gereinigter und aktivierter Proteinkinase C bestätigt (Watanabe 1985). Eine Phosphorylierung und damit Inaktivierung von N_i durch die Proteinkinase C wurde postuliert (Katada 1985).

Nachdem die Wirkung einiger Stimulatoren (z.B. Forskolin) auf die AC-Aktivität durch Phorbolester verstärkt werden konnte, wird auch eine Phosphorylierung von N_s durch die Proteinkinase C diskutiert (Bell 1985, Summers 1986).

Ebenso erscheint eine Beteiligung der cytosolischen Guanylatcyclase bei der Signalübermittlung gesichert, nachdem dieselben Ca^{2+}-mobilisierenden Rezeptoren, die eine Hydrolyse von Phosphoinositiden hervorrufen, auch die Bildung von cGMP stimulieren

(Berridge 1981). Die Aktivierung der Guanylatcyclase soll nach Berridge (1982) indirekt über Arachidonsäuremetaboliten erfolgen.

Rezeptoren:

Ebenso wie für das AC-System wurden für den Phosphoinositol-Metabolismus eine Reihe spezifischer Rezeptoren nachgewiesen. Oft sind es gleichartige Agonisten, die mit Rezeptoren dieser beiden Systeme reagieren können, wie z.B. muskarinartige cholinerge oder adrenerge Neurotransmitter. Doch die Art der Rezeptorbindungsstellen ist verschieden. Während die Adenylatcyclase über ß-adrenerge Rezeptoren stimuliert und über α_2-adrenerge Rezeptoren inhibiert werden kann, wurden α_1-adrenerge Rezeptoren in Verbindung mit dem Phosphoinositol-Turnover gefunden. Entsprechendes gilt für V_1 (Vasopressin)-, H_1 (Histamin)- und $5HT_2$ (5-Hydroxytryptamin)-Rezeptoren (Michell 1975, Berridge 1980), welche die Phosphoinositid-Hydrolyse beschleunigen. Dagegen stimulieren Vasopressin über V_2-, Histamin über H_2- und 5-Hydroxytryptamin über HT_x-Rezeptoren die Adenylatcyclase, bzw. findet eine AC-Hemmung über $5HT_1$-Rezeptoren statt (Fain et al. 1980, Berridge 1980). Die Unterklassen der Hormon- bzw. Neurotransmitterrezeptoren scheinen also häufig entweder mit dem AC-System oder dem Phosphoinositol-Turnover gekoppelt zu sein.

N-Regulatorproteine:

Sehr interssant sind auch Befunde von Nakamura und Ui (1985), die mit IAP an Mastzellen zeigen konnten, daß die α-Untereinheit von N_i (oder ein sehr ähnliches Protein) die stimulatorische Wirkung von Calcium-mobilisierenden Rezeptoren auf den Phosphoinositid-Metabolismus vermittelt. Eine Beteiligung des N_i-Proteins sowohl

bei der Inhibition der AC als auch bei der Aktivierung des Phospholipid-Stoffwechsels wird demzufolge nicht mehr ausgeschlossen.

Unschlüssig ist man sich noch über die Bedeutung eines aus Gehirnzellen isolierten, GTP-bindenden Regulatorproteins, N_o genannt, das ebenfalls aus drei Komponenten besteht: α_o (39 kDa), $ß_o$ (35 kDa) und γ_o (10 kDa) (Sternweis 1984, Neer 1984). α_o wird ebenfalls wie α_i durch IAP ADP-ribosyliert.

Daneben wurde überhaupt als erstes Reizsignal-vermittelndes Regulatorprotein das Transducin aus der Retina isoliert, dessen α_T-Komponente (37 kDa) sowohl von Choleratoxin als auch von IAP ADP-ribosyliert werden kann.

Der Phospholipid-Metabolismus pankreatischer Inseln in Verbindung mit der Insulinsekretion wurde 1984 von Best et al. zusammengefaßt. Versuche mit Glucose zeigten entweder eine Abnahme (Clements 1977, Montague 1980) oder beschleunigte Umsatzrate (Best 1983, Fex 1972) der Inositolphospholipide. Auch die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern durch Inositoltriphosphat wurde an RINm5F-Zellen gezeigt (Biden und Prentki 1984). Dies und andere Resultate weisen auf eine Beteiligung dieses second messenger Systems bei der Glucose-induzierten Insulinsekretion hin (Best et al. 1984).

Interesse erregte auch der Befund, daß Menadion, eine Substanz, die NAD(P)H-Spiegel in der Insel senkte ohne ATP zu beeinflussen, in der Lage war, die Glucose-induzierte ^{32}P-Markierung von Phospholipiden deutlich zu vermindern (Malaisse 1978). Auch Versuche mit NAD(P)H-Äquivalenten führten zu der Vermutung, daß

eine Beziehung zwischen der Bildung reduzierter Nikotinamid-Nukleotide und verstärktem Phospholipid-Turnover besteht (Best 1983, Malaisse 1979).

Ein Zusammenspiel von Adenylatcyclase und Phospholipid-Stoffwechsel in der Zellmembran Langerhansscher Inseln wird diskutiert, indem man die durch exogene Prostaglandine stimulierte Insulinsekretion mit einer Stimulation der AC-Aktivität durch eben diese Metaboliten der Arachidonsäurekaskade erklärt (Metz 1981, Heaney 1981).

All diese Befunde deuten darauf hin, daß die diversen Signalübertragungsmechanismen der Effektorzellen von großer Komplexität sind und vielseitiger gegenseitiger Beeinflussung unterliegen. Gemessene Einzelparameter (z.B. AC-Aktivität) sollten in diesem Zusammenhang interpretiert werden.

1.2. Fragestellung

1.2.1. Erstellung einer Methodik zur Messung der Adenylatcyclase-Aktivität in Membranfraktionen Langerhansscher Inseln

Seit 1977 wurden in unserem Arbeitskreis Messungen von cAMP-Spiegeln in isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte und umfangreiche Untersuchungen zur Bedeutung von Thiolen bei der Regulation des cAMP-Stoffwechsels durchgeführt. Da aber eine intakte Zelle und vor allem eine gesamte Langerhanssche Insel vielfältigen physiologischen Regulations- und Rückkopplungsmechanismen unterliegt, konnte bei einer Veränderung von intrazellulär gebildetem cAMP in isolierten Langerhansschen Inseln niemals von einer unmittelbaren Wirkung auf das Adenylatcyclase-System ausgegangen werden. Als Beispiel seien die physiologischen Regulatoren der Insulinsekretion genannt: Glucagon und Glucose. Wie unter 1.1.3. beschrieben, führen beide zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels, allerdings über völlig verschiedene Mechanismen.

Aus diesem Grunde war es von Interesse, ein in-vitro Testsystem zu erstellen, in dem die zellmembrangebundene Adenylatcyclase weitgehend isoliert - aber noch funktionsfähig - vorlag.

Wesentliche Anstrengungen zur Erstellung einer Methodik der AC-Aktivitätsmessung wurden im Zeitraum von 1980-1983 von U. Essig in unserem Arbeitskreis durchgeführt, da bereits beschriebene Techniken (Kuo 1973, Johnson 1974, Capito 1977, Valverde 1979) teilweise unzureichend erschienen.

- Zu Beginn der vorliegenden Arbeit sollte nun diese vorliegende Technik der Membranpräparation und AC-Aktivitätsmessung weiter

ausgeführt und vervollständigt werden. Zudem war der Nachweis für die Funktionsfähigkeit dieses Enzymsystems zu erbringen.
- Diese Methodik sollte dann auch auf die AC-Aktivitätsmessung in RIN-A2-Zellen angewandt und dementsprechend modifiziert werden.

1.2.2. Zur Bedeutung von Thiolen für die Regulation der Adenylatcyclase durch stimulatorische und inhibitorische Substanzen.

Von Ammon et al. (1984a) wurden eine Reihe von Stimulatoren der Insulinsekretion beschrieben, die durchweg auch zu einer vermehrten Bildung von cAMP führten. Während ein Teil der Substanzen (z.B. Glucose, pCMB, Tolbutamid) sich thiolabhängig zeigte, war der Effekt anderer Stoffe (z.B. Theophyllin, Isoproterenol, db-cAMP) thiolunabhängig (siehe 1.1.2.4.). Gerade diese Stoffe steigerten intrazelluläre cAMP-Spiegel über eine Hemmung der Phosphodiesterase (Theophyllin) oder über direkte Aktivierung der Adenylatcyclase (Isoproterenol, Glucagon).

Wie an anderen Geweben wurde aber auch an pankreatischen Inseln die Empfindlichkeit des cAMP-Adenylatcyclase-Systems gegenüber Thiolreagentien nachgewiesen (Capito 1977, Ammon/Heinzl 1982, Mukherjee 1984; siehe 1.1.3.3.).
Nachdem vor kurzem von Ammon/Müller (1985) festgestellt wurde, daß die Thioloxidantien Diamid und NEM in niedrigen Dosen zwar die basale und Glucagon-induzierte cAMP-Bildung nicht beeinflußten, aber überraschenderweise die starke Stimulation durch Forskolin sogar noch potenzierten, stellte sich die Frage, ob Thiolgruppen der Adenylatcyclase direkt am Zustandekommen dieser Effekte beteiligt waren.

a) Es sollte nun untersucht werden,

- ob Thioloxidantien in entsprechend niedriger Konzentration in der Lage wären, entweder die basale, die Forskolin-stimulierte oder die über N_i gehemmte AC-Aktivität in irgendeiner Form zu beeinflussen.

Voraussetzung dafür waren Versuche, die zeigen mußten,

- ob Forskolin, wie bei anderen Geweben vielfach beschrieben (Seamon 1981, Ross 1982), auch die Adenylatcyclase Langerhansscher Inseln direkt aktivierte,

- und ob diese Forskolin-Stimulation über ein postuliertes inhibitorisches N-Protein (Katada 1981, Malaisse 1984) gehemmt werden konnte. Die Aktivierung von N_i sollte dabei möglichst rezeptorunabhängig erfolgen.

b) Nachdem Ammon et al. (1984c) einen synergistischen Effekt von Thiouracilen auf die Glucose-induzierte Insulinsekretion entdeckten, und zwei dieser Derivate (Methylthiouracil = MTU und Propylthiouracil = PTU) in der Lage waren, v.a. in Ca^{2+}-freiem Medium die cAMP-Bildung deutlich zu verstärken, war eine direkte Interaktion mit dem AC-System denkbar.

- Deshalb sollte das potenteste Derivat PTU im Hinblick auf seinen Einfluß auf die Adenylatcyclase Langerhansscher Inseln getestet werden.

c) Die Bestimmung der AC-Aktivität in Membranpräparationen aus Pankreasinseln weist mehrere Nachteile auf. Zunächst bestehen Langerhanssche Inseln nicht einheitlich aus der gleichen Art von Zellen, von denen die insulinsezernierenden B-Zellen in der Gesamtinsel etwa einen Prozentsatz von 75-80% stellen. Zum

zweiten ist eine Membranpräparation aus Ratteninseln in der Menge sehr limitiert, da aus zeitlichen, finanziellen und arbeitstechnischen Gründen Langerhanssche Inseln nur in sehr begrenztem Umfang gewonnen werden können. Drittens muß eine eventuelle Schädigung von Oberflächenproteinen der Inseln durch die Isolationstechnik der Collagenaseverdauung in Betracht gezogen werden.

Nun wurden in den letzten Jahren vermehrte Anstrengungen unternommen, Tumor-Zellinien heranzuzüchten, die Insulin produzieren und sezernieren (Gazdar und Chick 1980). Eine Charakterisierung der in unserem Labor etablierten "rat insulinoma"-Zellinie (RIN-A2) wird unter 3.4.1.2. vorgenommen.

Obwohl diese Zellinien nicht genau die gleichen insulinsezernierenden Eigenschaften wie Langerhanssche Inseln haben, insbesondere was die insulinfreisetzende Wirkung von Glucose anbetrifft (der auf einen Glucoseaufnahmedefekt zurückgeführt wird), konnte gezeigt werden, daß sie mit einer Insulinsekretion auf die Behandlung mit Agentien reagieren, die die Adenylatcyclase stimulieren. So beobachteten Korman und Bhatena (1985), daß eine Glucagon-induzierte Insulinfreisetzung in RINm-Zellen mit einem Anstieg des cAMP-Gehaltes einherging. Davor waren bereits in RINm-Zellen und insulinsezernierenden Klonen Nachweise für die Existenz spezifischer Glucagon- und Somatostatin-Rezeptoren erbracht worden (Bhatena 1982), die mit dem AC-System gekoppelt sein könnten (Abb. 1.8.).

Es war nun ein Ziel dieser Arbeit, zu untersuchen,

- ob in groben Membranpräparationen von RIN-A2-Zellen eine AC-Aktivität feststellbar war,
- ob diese mit der Enzymaktivität Langerhansscher Inseln vergleichbar war,
- ob dieses AC-System von RIN-A2-Zellen mit einer Veränderung seiner Aktivität auf NaF, GppNHp und Forskolin ansprechen würde, Stoffen also, denen eine Interaktion mit C, N_s und N_i zugesprochen wird,
- und ob auch hier kritische Thiolgruppen bei der Regulation der Adenylatcyclase eine Rolle spielen. Dabei sollten ebenfalls die Thioloxidantien Diamid und NEM Anwendung finden.

2. MATERIAL

2.1. Versuchstiere

Für die Versuche wurden erwachsene Wistar-Ratten von 200-300 g Körpergewicht beiderlei Geschlechts verwendet. Dabei lag ihr Alter zwischen 3 und 5 Monaten. Die Tiere wurden in einem 12 h Tag/Nacht-Rhythmus bei ca. 24 °C Raumtemperatur und 55-65% relativer Luftfeuchtigkeit in Makrolonkäfigen gehalten. Sie erhielten Standardtrockenfutter der Firma Altromin Lage/Lippe, und Trinkwasser ad libitum.

2.2. Geräte

Apple II Europlus (64 k) Computer — Apple, USA

Automatischer Gamma-Zähler Modell 4233 — Fa. Nuclear Chicago Corp., Illinois, USA

Desk-Computer HP 9845B mit xy-Plotter — Hewlett and Packard, USA

Dounce Glashomogenisator — B.Braun, Melsungen

Du Pont Sorvall RC-5 Superspeed Refrigerated Centrifuge

Du Pont Luminescence Biometer — Du Pont, USA

Eppendorf-Reaktionsgefäße Nr.3810/3811

Eppendorf-Thermostat 5320

Eppendorf-Tischzentrifuge Nr.5413 — Eppendorf Gerätebau, Netheler und Hintz GmbH, Hamburg

Gelaire laminar air flow, class 100 — Gelman Instruments, Flow Laboratories GmbH, Meckenheim

Handzentrifuge 1011 — Fa. Hettich, Tuttlingen

Heraeus-Christ Kühlzentrifuge UJ II KS (mit Winkelrotor 8760)

Heraeus-Christ Microfuge HC 102

Heraeus Temperierschrank B 5060 E — Fa. Christ, Osterode

Kontron Hermle Centrikon H-401 (mit Kontron Hermle Rotor A 8.[illegible]	Kontron Her[illegible]
Magnetrührer IKA-Combimag RCT	Janke und Kunkel KG, Staufen
Nunclon Gewebekulturflaschen (80 cm^2)	Nunc Intermed, Denmark
Olympus Phasenkontrastmikroskop Modell IMT	Olympus Optical Co., LTD, Tokyo, Japan
pH-Meter H5 Modell 3560	Beckmann Instruments GmbH, München
Polytron PT 10-35 (nach Prof.P.Willems)	Bachofer, Reutlingen
Spectralphotometer PM 6	Zeiss
Stereomikroskop SM 6	Nikon, Japan
Tischcomputer Olivetti P 602	Olivetti GmbH
Ultraschallbad Econoclean	Spirig, Rapperswil, Schweiz
Vortex-Genie Whirlmix	Wilten&Co, Etten-Leur, Holland
Zell-Zählgläschen (geeicht)	Fuchs-Rosenthal

Die hier nicht aufgeführten Geräte entsprachen der üblichen Laborausrüstung.

2.3. Chemikalien und Enzyme

Adenosin-3':5'-monophosphat, cyclisch	New England Nuclear, Boston, USA
Adenosintriphosphat (ATP)	Boehringer Mannheim
Aminophyllin	Knoll-Ludwigshafen und Aldrich Chemical Corp. Milwaukee, USA
Collagenase (126-196 E/mg)	Worthington Biochem. Corp., Freehold, USA
cyclic-AMP Radioimmunoassay-Kit ^{125}I	New England Nuclear, Boston, USA
Diamid	Aldrich Chemical Corp., Milwaukee, USA
Dithiotreitol (DTT)	Boehringer Mannheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Foetales Kälberserum	Seromed, Berlin, FRG

Forskolin	Calbiochem-Behring Corp., La Jolla, USA
Guanosintriphosphat (GTP)	Boehringer Mannheim
Guanylylimidophosphat (GppNHp)	Boehringer Mannheim
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid (NaF)	Merck, Darmstadt
N-Ethylmaleimid (NEM)	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Penicillin G	Seromed, Berlin, FRG
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma Chemical Corp., St. Louis, USA bzw. Behringwerke Marburg
RPMI 1640	Seromed, Berlin, FRG
Saccharose (Sucrose)	Merck, Darmstadt
Somatostatin	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Streptomycin	Seromed, Berlin, FRG
Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan (Tris)	Boehringer Mannheim
Trypsin	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Zinkacetat ($ZnAc_2$)	Merck, Darmstadt

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, in der jeweils reinsten Form (p.a.) bezogen.

2.4. Nähr- und Reagenslösungen

2.4.1. Hanks' Lösung (Hanks und Wallace, 1949)

Stammlösung:	NaCl	80,00 g
	KCl	4,00 g
	$Na_2HPO_4*2H_2O$	0,60 g
	KH_2PO_4	0,60 g
	$MgSO_4*7H_2O$	2,00 g
	$CaCl_2*2H_2O$	1,85 g
	Aqua bidest	ad 1000,0 ml

Vor Gebrauch wurde diese Stammlösung mit destilliertem Wasser 1+9 verdünnt, mit 0,6 mg/ml (=3 mM) Glucose versetzt, um während der Inselisolation eine ausreichende Energieversorgung der Zellen zu gewährleisten, und anschließend mit $NaHCO_3$- Lösung auf pH 7,35 eingestellt.

2.4.2. Stammlösungen zur Herstellung der Pufferlösungen während des Versuchstages

2.4.2.1. Stammlösungen in Tris

Die folgenden Substanzen wurden in 50 mM Trispuffer (3,03 g Tris in 500 ml dest. H_2O) gelöst.

- Aminophyllin 5 mM: 228,2 mg Aminophyllin in 100 ml
  bzw. 10 mM: 228,2 mg Aminophyllin in 50 ml
- ATP 40 mM: 1,210 g $ATP*Na_2*3H_2O$ in 50 ml
- Diamid 0,5 mM: 17,2 mg Diamid in 200 ml
- DTT 20 mM: 154,2 mg Dithiotreitol in 50 ml
- EDTA 50 mM: 1,862 g $EDTA*Na_2*2H_2O$ in 100 ml
- GppNHp 1 mM: 54,6 mg GppNHp in 100 ml

- GTP 1 mM: 56,7 mg GTP*Na_2 in 100 ml
- $MgCl_2$ 1 M: 2,033 g $MgCl_2$*$6H_2O$ in 10 ml
- Na_2CO_3 0,4 M: 424 mg Natriumcarbonat in 10 ml
- NaF 500 mM: 420 mg Natriumfluorid in 20 ml
- NEM 10 mM: 125,1 mg N-ethyl-maleimid in 100 ml
- Sucrose 1 M: 34,2 g Sucrose in 100 ml
- $Zn(Ac)_2$ 0,4 M: 878 mg Zinkacetat in 10 ml

Diese Stammlösungen wurden bei +4 °C aufbewahrt und am Versuchstag in entsprechender Menge den Pufferlösungen zugesetzt. Die Stammlösungen von Aminophyllin, ATP, Diamid, DTT, GppNHp, GTP und NEM wurden spätestens nach 3 Wochen neu hergestellt.

2.4.2.2. Stammlösungen in anderen Lösungsmitteln

Aufgrund ihrer begrenzten Löslichkeit in H_2O (bzw. 50 mM Tris) mußten für die folgenden Substanzen andere Lösungsmittel verwendet werden:

- Forskolin 25 mM: 10,3 mg Forskolin in 1 ml Ethanol (100%)
- PMSF 100 mM: 174 mg PMSF in 10 ml 2-Propanol
- PTU 28 mM: 119 mg Propylthiouracil in 25 ml einer ca. 0,05 M NaOH-Lösung
- Somatostatin 20 uM: 0,25 mg Somatostatin in 7,631 ml einer 100 mM Essigsäurelösung (+ 1 mg/ml BSA) (Aktories et al. 1983a)

Während die PMSF-Lösung bei Zimmertemperatur gelagert werden konnte, mußten die Stammlösungen von PTU bei 4 °C, von Forskolin und von Somatostatin bei -20 °C aufbewahrt werden. Für die Versuche wurde die Somatostatin-Stammlösung portionsweise eingefroren.

Die PTU-Lösung mußte vor ihrer Verwendung mindestens 15 min bis auf Zimmertemperatur erwärmt und anschließend 5 min ins Ultraschallbad gegeben werden.
Eventuelle pH-Verschiebungen in den Stammlösungen wurden im Testpuffer austitriert.

2.4.2.3. Zur Verwendung des Lösungsmittels Ethanol bei der Herstellung der Forskolin-Stammlösung

Da Forskolin eine ambiphile, stark lipophile Sustanz mit nur geringer Löslichkeit in Wasser darstellt, mußte zur Herstellung der 25 millimolaren Stammlösung Forskolin in absolutem Ethanol gelöst werden. Diese Stammlösung konnte bei -20 °C mindestens 4 Monate aufbewahrt werden (Seamon et al. 1981).
Forskolin ist aufgrund seiner 7ß-Acetoxy-Gruppe in wäßrigem Medium hydrolyseanfällig. Aus diesem Grunde wurde die Forskolinstammlösung dem Testpuffer erst kurz vor Versuchsbeginn zugesetzt. Dabei ist Forskolin bis zu einer Konzentration von 200 uM in wäßrigem Medium löslich (Seamon et al. 1983).
Von verschiedenen Seiten wurde von einer Steigerung sowohl der basalen als auch der durch Hormone- und GppNHp-stimulierten Adenylatcyclaseaktivität durch kurzkettige Alkohole berichtet (Gorman et al. 1970; Stock et al. 1978; Rabin et al. 1981; Hungen et al. 1982).
Dagegen wurde in der Langerhansschen Insel lediglich von Kuo und Mitarbeitern (1973) von einer geringfügigen Steigerung der basalen Aktivität des Enzyms unter dem Einfluß von 0,05% Ethanol berichtet, während höhere Konzentrationen keinen Einfluß hatten.

Karl und Mitarbeiter konnten 1975 eine Beeinflußung der AC-Aktivität Langerhansscher Inseln durch Ethanol (1%) ausschließen. Auch in Untersuchungen zur Wirkung von Ethanol (0,0005 - 2,5%) auf basale cAMP-Spiegel in der intakten Insel konnte keine Beeinflußung festgestellt werden (Ammon/ Müller 1984c).
In dieser Arbeit reichten die Ethanolkonzentrationen bei Erstellung der Forskolin-Dosis-Wirkungskurve von 0,0004 - 0,4% (100 uM Forskolin).

2.4.3. Zusammensetzung der Pufferlösungen für die Membranpräparation und den Adenylatcyclasetest

Jeder Puffer mußte auf pH 7,5 eingestellt werden; in Klammern sind die gewünschten Endkonzentrationen bei der Membranpräparation (Wasch- und Homogenisationspuffer) bzw. im AC-Test (Membranpuffer) angegeben.
Auf besondere Versuchsbedingungen (z.B. Verzicht auf den Zusatz von DTT bei den Versuchen mit Thioloxidantien) wird im Ergebnisteil gesondert hingewiesen.

2.4.3.1. Waschpuffer (20 ml)

Da die Inselisolation mit Hanks' Puffer erfolgte, für die Membranpräparation und den anschließenden Adenylatcyclasetest aber in Tris-Puffer gearbeitet wurde, mußte zunächst über einen Waschpuffer ein Medienwechsel erfolgen. Dadurch wurde weitestgehend eine Verschleppung von Hanks' Puffer vermieden.

Tris	16,200 ml	(50 mM)
Sucrose	3,800 ml	(190 mM)

2.4.3.2. Homogenisationspuffer (20 ml)

(bei der Membranpräparation wurden zu 1 ml Waschpuffer 4 ml Homogenisationspuffer gegeben)

Tris	14,265 ml	(50 mM)
Sucrose	3,660 ml	(183 mM)
EDTA	50 ul	(0,1 mM)
GTP	750 ul	(30 uM)
PMSF	25 ul	(0,1 mM)
DTT	1,250 ml	(1 mM)

2.4.3.3. Membranpuffer (10 ml)

Tris	7,740 ml	(50 mM)
Sucrose	1,430 ml	(143 mM)
EDTA	20 ul	(0,1 mM)
GTP	300 ul	(30 uM)
PMSF	10 ul	(0,1 mM)
DTT	500 ul	(1 mM)

2.4.3.4. Testpuffer (10 ml)

Tris	7,035 ml	(50 mM)
Sucrose	970 ul	(96 mM)
EDTA	30 ul	(0,1 mM)
GTP	450 ul	(30 uM)
$MgCl_2$	125 ul	(5 mM)
PMSF	15 ul	(0,1 mM)
DTT	750 ul	(1 mM)
BSA	25 mg	(0,1%)
ATP	625 ul	(1 mM)

2.4.4. 0,05 M Natriumacetatpuffer pH 6,2

Bestandteil des Cyclic AMP (^{125}I) RIA Kit von NEN.

2.4.5. Acetylierungsgemisch

Triethylamin	2 Teile
Acetanhydrid	1 Teil

Bestandteil des Cyclic AMP (^{125}I) RIA Kit von NEN.

2.4.6. Nährmedium für die Zellinie RIN-A2

Als Nährmedium für die Ratteninsulinoma-Zellinie RIN-A2 wurde RPMI 1640 verwendet. Zugesetzt wurden 10% foetales Kälberserum und die Antibiotika Penicillin G und Streptomycin.

2.4.7. Zu untersuchende Substanzen

Alle zu untersuchenden Substanzen wurden in der entsprechenden Konzentration entweder dem Testpuffer oder, wenn eine definierte Vorinkubationszeit nötig war, der Aminophyllinlösung zugesetzt. Dadurch ergaben sich pro Versuchstag meist 3-4 verschiedene Testpuffer, die die zu untersuchende Substanz (z.B. GppNHp) in verschiedenen Konzentrationen enthielten, und evtl. mehrere Aminophyllinlösungen, die z.B. ein Thioloxidans enthielten.

3. METHODIK

3.1. Versuchsplanung

Um eventuelle Fehler, die durch einen ständig gleichen Versuchsablauf bedingt sind, zu vermeiden, wurde die Reihenfolge der Proben für jeden Versuch neu ermittelt.

Eine zufällige Probenreihenfolge kann entweder durch willkürliches Ziehen von numerierten Zetteln oder mit Hilfe einer Zufallszahlentabelle bzw. eines Zufallsgenerators erhalten werden.

a) Zufallszahlentabelle: Bei einem Versuch, der z.B. 20 Tests umfaßt, werden 20 dreistellige Zahlen hintereinander aus einem Zufallszahlenblatt entnommen, diese werden ihrer Reihenfolge gemäß den Tests 1 bis 20 zugeordnet und anschließend nach ihrer Größe geordnet. Somit wird eine zufällige Durchmischung der Testansätze erreicht.

b) Zufallszahlenprogramm: Da der Apple II-Europlus PC einen Zufallszahlengenerator besaß, konnte mit Hilfe eines kleinen Basic-Programmes (modifiziert nach Apple Tutorial) sehr schnell eine zufällige Probenreihenfolge erhalten werden. Die Anzahl der Proben pro Versuch war dabei frei wählbar.

Nachfolgend die Auflistung dieses Programmes:

```
100  REM   RANDOMISIERUNGSPROGRAM
     M FUER EINE BELIEBIGE ANZAHL
      VON TESTANSAETZEN
110  REM  GRUNDSCHEMA DIESES PROG
     RAMMES SIEHE APPLE-TUTORIAL
     S.109
120  REM
150  INPUT " WIEVIELE TESTANSAETZ
     E SOLLEN RANDOMISIERT WERDEN
     ?";Z
160  REM
170  REM
200  REM  DIMENSIONIERUNG DES ARR
     AY
210  DIM TESTS(Z)
215  REM
220  REM  AUFFUELLEN DES ARRAY
230  FOR I = 1 TO Z
240 TEST(I) = I
250  NEXT I
255  REM
260  REM  DURCHMISCHEN DES ARRAY
     UND AUSWAEHLEN VON JEDEM ELE
     MENT
270  FOR A = 1 TO Z
275  REM
280  REM  AUSWAHL EINES ANDEREN E
     LEMENTES
290 B =  INT ( RND (1) * Z) + 1
295  REM
300  REM  "WAR A VERSCHIEDEN VON
     B?
310  REM  WENN NICHT, DANN ERNEUT
     ER VERSUCH"
320  IF A = B THEN  GOTO 280
325  REM
330  REM  WECHSEL VON TESTS(A) UN
     D TESTS(B)
340 X = TESTS(A):TESTS(A) = TESTS
     (B):TESTS(B) = X
350  NEXT A
355  INPUT "PAPIER EINGELEGT?";Y$

358  REM
360  REM  DRUCKERANSTEUERUNG UND
     AUSDRUCK DER WERTE
365  PR£ 1
367  PRINT : PRINT "DIE TESTANSAE
     TZE IN RANDOMISIERTER REIHEN
     FOLGE SIND:"
370  FOR C = 1 TO Z
380  PRINT TESTS(C),
390  NEXT C
395  PR£ 0
400  END
```

3.2. Einzelschritte des Versuchsablaufes

Der gesamte Versuchsablauf zur Bestimmung der Adenylatcyclase-Aktivität läßt sich generell in 5 Schritte unterteilen:

a) Isolierung der Langerhansschen Inseln bzw.
   Gewinnung der RIN-A2-Zellen

b) Membranpräparation

c) Adenylatcyclase-Test

d) Auswertung mittels Radioimmunoassay für cAMP

e) Proteinbestimmung

3.3. Schematische Darstellung des Versuchsablaufes

Schematisch stellt sich der Versuchsablauf folgendermaßen dar:

a) Inselisolation

Rattenpankreas

↓ zerschneiden, Collagenase-verdauung, auslesen

Langerhanssche Inseln in leicht hypotonem Homogenatpuffer (ca. 288 mOsm.)

o d e r

Gewinnung von RIN-A2-Zellen

RIN-A2-Zellen in Gewebekulturflaschen

↓ ablösen, auszählen, waschen

RIN-A2-Zellen in leicht hypotonem Homogenatpuffer (ca. 288 mOsm.)

b) Membranpräparation

Zerkleinern der Inseln bzw. Zellen im Polytron

(15 sec, Stufe 2)

1.Zentrifugationsschritt: 100*g, 3*1min

Abzentrifugieren der Zelltrümmer

Entnahme der Membranfetzen aus dem Überst.

2.Zentrifugationsschritt: 50 000*g, 30 min

Abzentrifugieren der Zellmembranen

Überstand: Lipide, lösl. Enzyme —— verwerfen

(PDE,ATPasen, unspez.Phosphohydrolasen)

Pellet + hypotoner Membranpuffer (245 mOsm.)

Resuspendieren des Pellets in kleinem

Glashomogenisator

c) Adenylatcyclasetest

Probenentnahme zur Protein-

bestimmung

20 Testansätze

Start durch Zugabe des Testpuffers, der ATP enthält

30 min

Stop durch kochendes Wasserbad (3 min)

in flüssigen N_2 geben, Aufbewahrung bei -20 °C

d) Radioimmunoassay

acetylierte Durchführung des cAMP-Kits

(Steigerung der Empfindlichkeit bis ca. 10 femtomol)

e) Proteinbestimmung

Lowry, modifiziert nach Peterson bzw.

Dye, modifiziert nach Biorad

3.4. Beschreibung des Versuchsablaufes

3.4.1. Gewinnung des Ausgangsmaterials: Langerhanssche Inseln oder RIN-A2-Zellen

Zunächst wurden ausschließlich Langerhanssche Inseln der Ratte als Ausgangsmaterial für die Membranpräparation und AC-Aktivitätsmessung verwendet. Als in der Folgezeit die Ratteninsulinoma-Zellinie RIN-A2 in unserem Labor etabliert war, wurde auch mit diesen Inseltumorzellen gearbeitet.

3.4.1.1. Methode zur Gewinnung und Isolierung Langerhansscher Inseln

Die Isolierung der Inseln erfolgte nach der von Lacy und Kostianovsky 1967 beschriebenen Methode der Collagenase-Verdauung.

Diese Methode basiert auf dem Prinzip der Verdauung des exokrinen Pankreasanteils durch das Enzym Collagenase, während die Langerhansschen Inseln als endokriner Pankreasteil nicht oder nur geringfügig angegriffen werden. Dadurch kann eine saubere Trennung der Langerhansschen Inseln von exokrinem Pankreasgewebe erreicht werden.

Bei der durch Äther narkotisierten Ratte wurde das Abdomen durch einen Längsschnitt bis zum Brustbein und beidseitig durch zwei Querschnitte in Rippen- und Brusthöhe geöffnet. Unter dem Leberlappen konnte nun das Duodenum mit einer Pinzette hervorgezogen werden, um den Ductus pancreaticus sichtbar zu machen. Dieser wurde zur Leber hin mit einem Bindfaden abgebunden und das

Duodenum zum Magen hin abgeklemmt.

Durch Einspritzen von 10 ml eisgekühlter Hanks' Lösung in den Ductus pancreaticus blähte sich das Pankreas deutlich auf und wurde gallertartig transparent, so daß es sich gut mit einer Schere von Darm, Magen, Milz und Leber abtrennen ließ. Es wurde in eine Petrischale mit eiskalter Hanks' Lösung gelegt und von sämtlichen Fettpartikeln befreit.

Das Gewebe wurde nun mit einer Schere in möglichst gleichmäßige kleine Teile zerschnitten, die sich dann durch den Konus einer 5 ml Rekordspritze aufsaugen ließen. Die auf diese Weise zerkleinerten Pankreata von 2 Ratten wurden zusammen in einen 25 ml Messzylinder gegeben und mit eiskalter Hanks' Lösung aufgefüllt. Nach Absitzen der Pankreaspartikel wurde der Überstand abgesaugt und der ganze Vorgang nochmals wiederholt, so daß sich nur noch sehr wenig klarer Überstand über den zerschnittenen Pankreata befand.

Der zuvor tarierte Messzylinder wurde ausgewogen und das resultierende Pankreasgewicht bestimmte die einzusetzende Menge an Collagenase. Je nach Qualität hatte jede Charge der Collagenase eine von der Firma mitgeteilte Aktivität, z.B. 138 E/mg. Pro Gramm Pankreas wurden nun 650 Einheiten eingesetzt, d.h. bei 5 g Pankreasgewicht sollten 20 mg Collagenase zugegeben werden.

Sofort nach Zugabe der Collagenase wurde der Messzylinder in ein auf 37 °C temperiertes Wasserbad gegeben, das auf einem Magnetrührer mit Heizplatte stand. Ein kleiner Magnetfisch sorgte in den ersten 2 Minuten für starke Durchmischung (ca 1100 U/min); anschließend verlief der Verdauungsprozess noch ca. 14-16 Minuten

bei verlangsamter Geschwindigkeit des Magnetrührers.
Die Verdauung wurde beendet durch Zugabe von ca. 15 ml eiskalter Hanks' Lösung, um das Enzym zu inaktivieren. Die gesamte Flüssigkeit gab man in ein kleines Gläschen und homogenisierte sie noch weiter durch 15-20 maliges Aufziehen durch den Konus einer 25 ml-Rekordspritze. Die Suspension wurde nun wieder in den Messzylinder gegeben.

Aufgrund des höheren spezifischen Gewichts der Langerhansschen Inseln im Verhältnis zu den exokrinen Partikeln, setzten sich die Inseln schneller am Boden des Zylinders ab, und der Überstand mit dem exokrinen Anteil und der gelösten Collagenase konnte abgesaugt werden. Den Unterstand schwemmte man mit eiskalter Hanks' Lösung wieder auf und ließ die Inseln erneut absitzen. Nach 2-3 maliger Wiederholung dieses Vorganges konnten die Inseln unter dem Stereomikroskop mit einer Mikropipette vollständig vom exokrinen Gewebe getrennt werden.

Pro Versuchstag erhielt man aus 4 Rattenpankreata ca. 500-700 Langerhanssche Inseln. Um den Pufferwechsel von Hanks' Puffer auf Tris-Puffer zu vollziehen, wurden die Inseln zusammen in etwa 8 ml des Waschpuffers gegeben, der aus einer ungefähr isotonischen Lösung von Sucrose (190 mM = ca 295 mOsm.) in Tris-Puffer bestand.
Die Inseln ließ man etwa 5-10 min absitzen, und konnte anschließend den klaren Überstand bis auf knapp 1 ml Restvolumen abnehmen.
Alle Arbeitsschritte erfolgten unter Eiskühlung.

3.4.1.2. Charakterisierung und Aufzucht der Tumor-Zellinie RIN-A2; Gewinnung der Einzelzellen

a) Herkunft: Die in unserem Labor von Prof. E. Verspohl und M. Kühn etablierte klonale, kontinuierliche Ratteninsulinoma-Zellinie geht auf einen von Chick 1977 erzeugten Inselzelltumor zurück. Dieser konnte durch Transplantation weiter erhalten werden.

Eine Primärkultur wurde nach Heterotransplantation in thymuslose nackte Mäuse von Gazdar 1980 erzeugt. Diese konnte nachfolgend in Zellkultur etabliert werden. Damit entstand die kontinuierliche Zellinie RIN-m.

Durch Klonierung und Subklonierung erhielt man in der folgenden Zeit Insulinklone (z.B. RIN-m5F), Somatostatinklone (RIN-m14B) und nichtsezernierende Klone (Oie 1983).

Die 1985 aus dem Labor von Dr. C.B. Wollheim (Genf) in unser Labor überführte Zellinie RIN-A2 gehört zu den insulin-sezernierenden Subklonen.

b) Aufzucht und Charakterisierung: Die Zellinie RIN-A2 wurde in Monolayer-Kultur in einer befeuchteten Atmosphäre von 37 °C gehalten, die neben 95% Luft noch 5% CO_2 enthielt.

Dem käuflich erworbenen Nährmedium RPMI 1640 wurden 10% foetales Kälberserum, 26 mM $NaHCO_3$ und Antibiotika (100 IU/ml Penicillin G und 100 ug/ml Streptomycin) zugesetzt. Während das foetale Kälberserum u.a. nicht genau definierte Wuchsstoffe und Adhäsionsfaktoren enthielt, diente die Antibiotika-Zugabe dazu, eventuelle geringfügige bakterielle Kontaminationen abzutöten.

Ein Mediumwechsel erfolgte alle 3-4 Tage, eine Subkultivierung

(=Umsetzen) 1 mal pro Woche nach Ablösen der Zellen mit 0.025% Trypsin/ 0.27 mM EDTA in Ca^{2+}- und Mg^{2+}-freier Dulbecco-Lösung (phosphatgepuffert) mit anschließender Verdünnung der Zellsuspension auf 0.05-0.2 x 10^6 Zellen/ml Medium.
Alle Arbeiten wurden möglichst keimfrei unter einer Laminar-flow-Box durchgeführt.
Die Populationsverdopplungszeit betrug in der exponentiellen Wachstumsphase zwischen Tag 3 und 4 ca. 24 h (=log-Phase des Wachstums). (Daten von M. Kühn)

c) Gewinnung der Einzelzellen: Die Gewebekulturflaschen enthielten zum Zeitpunkt des Aberntens (Tag 4-6) zwischen 2 und 15 Millionen Zellen in 20 ml Medium, die in einer Monolayer-Schicht am Gefäßboden hafteten. Für einen Versuch wurden zwischen 1,5 und 5 Millionen Zellen eingesetzt.
Nach vollständigem Abgiessen des Nährmediums wurden die anhaftenden Zellen mit ca. 10 ml Waschpuffer bedeckt (Sucrose + Tris), der zusätzlich 0,1 mM EDTA enthielt. Da diese Lösung kein Ca^{2+} enthielt und evtl. noch vorhandene Ca^{2+}-Ionen durch EDTA abgefangen wurden, liessen sich die Zellen nach ca. 5-10 min durch mehrmaliges Klopfen an die Flasche nahezu vollständig ablösen.

Die Verwendung einer Trypsin/EDTA-Lösung wie bei der Subkultivierung der Zellen war nicht angezeigt, da das Verdauungsenzym Trypsin die Adenylatcyclase zu stimulieren vermag (Aktories et al. 1982).

Diese Zellsuspension wurde nun in ein Zentrifugenröhrchen (10 ml) gegeben und die Zellen mittels einer Handzentrifuge pelletiert. Den Überstand saugte man soweit wie möglich ab und bedeckte das Pellet erneut mit Waschpuffer. Nach Resuspension der Zellen mit Hilfe einer Pasteurpipette wurde dieser Zentrifugationsvorgang nochmals wiederholt und der Waschpuffer bis auf knapp 1 ml abgesaugt.

Die Durchführung dieser Arbeitsschritte erfolgte bei Zimmertemperatur.

3.4.2. Membranpräparation

Man gab nun zu den knapp 1 ml der Insel- bzw. RIN-A2-Zellsuspension genau 4 ml des eisgekühlten Homogenatpuffers, der neben Tris und Sucrose (183 mM = ca 288 mOsm.) zur Einstellung der Osmolarität auch bereits Substanzen enthielt, die zur Versorgung der zerstörten Zellverbände benötigt wurden. Während EDTA störende zweiwertige Metallionen abfangen sollte, wurde bereits jetzt GTP zugegeben, um eine Bindung des Nukleotids an das Adenylatcyclase-Enzymsystem zu ermöglichen. DTT sollte als Antioxidans kritische Membranthiole vor Oxidation durch Luftsauerstoff schützen; daneben wurde noch PMSF als Proteasenhemmstoff zugesetzt.

Als Gefäß zur Homogenisation wurde ein dickwandiges Reagensglas verwendet, das in seinem Durchmesser dem Polytronstator entsprach. Den Polytron ließ man zunächst in Homogenatpuffer einige Sekunden vorlaufen, um eine Benetzung des Stators und ein Warmlaufen des Motors zu erreichen. Danach wurde der Stator in das Reagensglas mit der Inselsuspension getaucht und der Polytron-

Homogenisator für genau 15 Sekunden bei Stufe 2 eingeschaltet. Der Puffer mit den zerkleinerten Inselzellen wurde nun sofort in ein Plastikzentrifugenröhrchen umgeschüttet und in den auf 4 °C vorgekühlten Rotor einer Christ-Cryofuge gestellt.

Bei diesem ersten Zentrifugationsschritt ließ man die Zentrifuge 3*1 min bei 1000 U/min rotieren, was einer Beschleunigung von ca. 50-100*g entsprach. Vom Überstand wurden nach der 1. Minute 2 ml, dann jeweils noch 1 ml abgenommen, so daß ein Endvolumen von 4 ml resultierte.

Bei diesem Vorgang sollten größere Zellbruchstücke oder ganze Zellen sedimentieren, während die Membranpartikel bei einer derart geringen Beschleunigung im Überstand verblieben. Störende Lipide wanderten bei dieser Drehzahl bereits in Richtung der Flüssigkeitsoberfläche, so daß die Entnahme ebenfalls möglichst nicht aus dieser allerobersten Schicht erfolgen sollte.

Von diesen 4 ml Homogenat wurden nun 180 ul zur ersten Proteinbestimmung entnommen.

Die nahezu klare Suspension wurde auf 2 verschließbare Plastikzentrifugengefäße aufgeteilt, diese wurden genau austariert und in den Rotor A 8.24 der Kontron-Hermle Centrikon H-401 gestellt. Um eine Beschleunigung von ca. 50 000*g zu erreichen, mußte mit der Maximalgeschwindigkeit von 20 000 U/min gefahren werden.

Dieser 2. Zentrifugationsschritt bewirkte eine Sedimentation der Membranpartikel, so daß eine Abtrennung von löslichen Lipiden und Enzymen, wie z.B. der löslichen Phosphodiesterase, möglich wurde.

Nach 30 min wurden die Plastikgefäße aus der Zentrifuge entnommen und der Überstand vorsichtig abgegossen. Das sehr kleine Pellet wurde mit jeweils 250 ul des (gegenüber dem Homogenatpuffer etwas

hypotoneren) Membranpuffers bedeckt und auf dem Whirlmix von der Wandung gelöst. Um die Membranfetzen wieder voneinander zu lösen und um eine gleichmäßige Verteilung in den insgesamt 500 ul Puffer zu erreichen, wurde das Pellet in einem kleinen Dounce-Homogenisator durch 6 vorsichtige Hübe resuspendiert.

3.4.3. Adenylatcyclase-Test

Es wurden 20 Testansätze mit jeweils 100 ul Gesamtvolumen durchgeführt. Diese 100 ul setzten sich aus 40 ul der 50 000*g-Membranfraktion bzw. 40 ul Membranpuffer (Kontroll-Leerwerte), 20 ul Aminophyllinlösung und 40 ul des Testpuffers zusammen.
Dabei enthielt der Testpuffer weitere Substanzen, die für die Funktion der Adenylatcyclase unabdingbar waren, wie Mg^{2+}-Ionen und ATP als Substrat für die Bildung des cAMP. Auf ein ATP-regenerierendes System, wie es von anderen Arbeitsgruppen verwendet wurde, konnte aus den unter 4.2.2. angeführten Gründen verzichtet werden, zumal Bestandteile dieser ATP-regenerierenden Systeme Einflüsse auf die Adenylatcyclase-Aktivität zeigen können (Johnson 1980).

3.4.3.1. Versuche zur Basalaktivität und Stimulation der AC

Nach 2 minütiger Vorinkubation des Testpuffers und der Aminophyllinlösung bei 37 °C in einem Eppendorf-Thermostat erfolgte nach einem randomisierten Testschema der Teststart durch Zugabe der Membranpräparation bzw. des Membranpuffers.
Die Tests wurden nun 30 min inkubiert und jede Testprobe nach 10 min und 20 min kurz auf dem Whirlmix durchmischt. Nach Beendigung dieses Zeitraumes wurden die Proben nacheinander in ein kochendes

Wasserbad gegeben und nach jeweils 3 min direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dadurch erfolgte eine Inaktivierung des Enzyms, wobei das gebildete cAMP als sogenannter "heat-resistant factor" (Sutherland 1957) erhalten blieb.

Dieser Reaktionsstop durch kochendes Wasserbad hat gegenüber dem Teststop-Verfahren mit Trichloressigsäure (TCA) den Vorteil, daß kein Ausschütteln der TCA mit Äther erforderlich wird. Allerdings ist die Hitzeinaktivierung nicht für kurze Testzeiträume (z.B. 5 min) geeignet, da nicht wie bei der TCA-Methode ein sekundengenauer Teststop garantiert werden kann. Über eine Testdauer von 30 min macht sich diese evtl. Ungenauigkeit aber nicht mehr bemerkbar.

Die Aufbewahrung der Testproben erfolgte bis zur Auswertung mittels RIA im Gefrierfach bei -20 °C.

Da von den ursprünglich 500 ul Membranpräparation nach Abnahme von 10*40 ul noch ca. 100 ul verblieben, konnte nach Bestimmung des genauen Volumens noch eine zweite Proteinbestimmung durchgeführt werden (siehe Beschreibung Dye-Biorad bzw. Lowry modifiziert nach Peterson).

3.4.3.2. Versuche zur Hemmung der AC

Für die Versuche, bei denen eine Hemmung der Forskolin-stimulierten AC durch GTP bzw. GppNHp erwartet werden konnte, mußten etwas veränderte Testbedingungen gewählt werden. Der Nachweis einer Hemmung der AC, die vom inhibitorischen N-Protein übertragen wird, gelingt am besten unter folgenden Voraussetzungen (Jakobs 1984, persönliche Mitteilungen):

a) Relativ niedrige Temperatur (ca. 25 °C) während des AC-Tests, da das N_s-Protein für seine stimulatorische Wirkung höhere Temperaturen benötigt, das N_i-Protein aber bereits in niedrigeren Temperaturbereichen aktiv ist.

b) Die Mg^{2+}-Ionen Konzentration sollte niedriger sein als bei anderen Untersuchungen (5 mM), da das N_s-Protein sehr viel mehr Mg^{2+}-Ionen zur Aktivierung benötigt als das N_i-Protein. Andererseits wird von der katalytischen Einheit eine gewisse Mindestkonzentration von Mg^{2+}-Ionen benötigt, um überhaupt erst aktiv werden zu können.
Um also die Basalaktivität der AC nicht zu stark zu senken, wurden für diese Versuche nur 2 mM $MgCl_2$ eingesetzt.

Durch diese Maßnahmen kann eine Überlagerung der Hemmwirkung über N_i durch eine gleichzeitige Stimulation der AC über N_s vermindert werden.

3.4.3.3. Versuche mit Thioloxidantien

a) Versuche mit Diamid:

Nach den Untersuchungen von Kosower et al. (1969 und 1978) wird Diamid als relativ spezifisches Oxidationsmittel für GSH angesehen, wobei daneben auch Thiolgruppen von Proteinen zu gemischten und reinen Disulfiden oxidiert werden können.
Da bei einer Zellmembranpräparation nicht mit der Anwesenheit von üblicherweise im Plasma befindlichem GSH gerechnet werden kann, beschränkt sich hier die Wirkung des Diamid auf die Oxidation von Proteinthiolen.

Um bereits zu Versuchsbeginn von einem möglichst maximal oxidierten Zustand dieser Thiolgruppen ausgehen zu können, wurden vor Beginn der Hauptinkubation die jeweils 40 ul der Membranpräparation 10 min lang bei Versuchstemperatur mit der entsprechenden Konzentration von Diamid (0.1 mM) vorbehandelt.

Da die Untersuchungen des cAMP-Spiegels in der intakten Langerhansschen Insel mit 0.1 mM Diamid durchgeführt worden waren, wurde Diamid bei Messungen der AC-Aktivität ebenfalls in der Konzentration von 0.1 mM eingesetzt.
Höhere Diamid-Konzentrationen hatten in der intakten Insel eine Abnahme der ATP-Spiegel zur Folge (Ammon 1982).

b) Versuche mit N-Ethylmaleimid

N-Ethylmaleimid (NEM) ist ein alkylierendes Reagens, das mit GSH und anderen Thiolen in der Zelle zu reagieren vermag (Vogt et al. 1971).
Ebenso wie bei cAMP-Bestimmungen in intakten Langerhansschen Inseln wurde zunächst mit 0.1 mM NEM gearbeitet, da diese Konzentration noch nicht zu einer signifikanten Abnahme der katalytischen Aktivität der AC führte, während bei höheren Konzentrationen von NEM eine Abnahme sowohl der basalen als auch der Forskolin-stimulierten AC-Aktivität festzustellen war (Aktories et al. 1982).

3.4.4. cAMP-Radioimmunoassay

Da aufgrund der pro Versuchstag isolierbaren Inselanzahl enge Grenzen für die Menge an Zellmembranen gesetzt waren (ca 1 ug pro Versuchsansatz), mußte für die Bestimmung des gebildeten cAMP eine sehr empfindliche Messmethode verwendet werden.
Hierfür geeignet erschien der kommerzielle cAMP-RIA-Kit von New England Nuclear, der zunächst nach der Standardmethode durchgeführt wurde. Um überhaupt messbare cAMP-Spiegel bei basaler AC-Aktivität zu erhalten, mußten allerdings ca. 1000 Inseln pro Versuchstag eingesetzt werden. Andere Bestimmungsmethoden, wie z.B. die Proteinbindungsmethode nach Gilman (1970), waren zur Messung der geringen cAMP-Spiegel nicht empfindlich genug.
Um auch mit einer geringeren Inselanzahl auszukommen, wurde der RIA nach der von Harper und Brooker (1975) und von Frandsen und Krishna (1976) beschriebenen Modifikation durchgeführt. Dabei wurde die Empfindlichkeit des Radioimmunoassays bis in den fmol (10^{-15}mol)-Bereich durch Acetylierung des zu bestimmenden cAMP's gesteigert.

3.4.4.1. Prinzip des RIA

Der Radioimmunoassay beruht auf dem Grundprinzip einer Konkurrenzreaktion zwischen einem radioaktiven und einem nicht radioaktiven Antigen um eine definierte Menge spezifischen Antikörpers (siehe folgendes Schema).

Schema:

markiertes Antigen + spezifischer Antikörper ⟶ markierter Antigen-Antikörper-Komplex

AG* + AK → AG*-AK

unmarkiertes Antigen (in unbekannten Proben)

AG

↓

unmarkierter Antigen-Antikörper Komplex

AG-AK

Wenn eine unbekannte Menge unmarkierten Antigens aus den Testproben und eine definierte Menge radioaktiv markierten Antigens mit einer bestimmten begrenzten Menge des Antikörpers reagieren können, werden mit steigendem Anteil des unmarkierten Antigens immer geringere Mengen des markierten Antigens an den Antikörper gebunden. Die Trennung des Antigen-Antikörper-Komplexes von überschüssigem freien Antigen (markiert) wird durch Ausfällung und Abzentrifugieren des Antigen-Antikörper-Komplexes mittels eines Präzipitators erreicht.

Der RIA für cAMP wurde von Steiner et al. (1972) entwickelt. Der Antikörper des RIA-NEN-Kits wird durch Injektion eines 2'O-Succinyl-cAMP-Protein-Konjugates aus Kaninchen gewonnen (Brooker 1982). Als markiertes Antigen wird ein cAMP-Derivat verwendet, der Succinyl-cAMP-Tyrosinmethylester (I^{125}), da ein in 2'ortho-Position substituiertes cAMP eine höhere Affinität zum Antikörper besitzt. Dies ist auch der Grund, weshalb das zu bestimmende cAMP in 2'O-Stellung acetyliert wird.

3.4.4.2. Durchführung des RIA

a) Eichkurve:

Vor der eigentlichen Durchführung des RIA mußte eine Eichkurve mit dem von NEN gelieferten cAMP-Standard erstellt werden. Die Aufarbeitung der Eichkurve sollte dabei unter den gleichen Versuchsbedingungen wie der AC-Assay erfolgen. Um die Anwesenheit aller eventuell die Bindungsaffinität beeinflußenden und damit störenden Substanzen zu gewährleisten, wurde die Verdünnungsreihe nicht mit NaAc-Puffer (wie im Kit-Manual vorgeschlagen) hergestellt, sondern unter Verwendung des Membranpuffers. Dazu wurde (wie bei den Testproben) Aminophyllinlösung und Testpuffer gegeben, im gleichen Verhältnis (40 ul + 20 ul + 40 ul) wie im Versuch. Diese Eichkurven-Standards wurden ebenfalls 30 min inkubiert, 3 min gekocht und in flüssigem N_2 eingefroren.

b) Aufarbeitung der Proben aus dem AC-Test

Nach Auftauen der Proben bei Zimmertemperatur wurden jeweils 75 ul 0,4 M $Zn(Ac)_2$-Lösung und 75 ul 0,4 M Na_2CO_3 zugegeben. Damit sollte durch das sich niederschlagende $ZnCO_3$ auch überschüssiges ATP ausgefällt werden (Thams et al. 1984). Zudem wurde dadurch die für Doppelbestimmungen notwendige Verdünnung auf 250 ul erreicht und das durch den Erhitzungsvorgang ausgefallene Protein konnte leichter abgetrennt werden.

Alle Proben wurden nun in der Heraeus-Christ Microfuge HC 102 15 min bei 10 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand von jeweils ca. 215 ul wurde vorsichtig abpipettiert und in entsprechend vornumerierte Eppendorf-Cups überführt.

Die anschließende Acetylierung erfolgte mit frisch hergestelltem

Acetylierungsgemisch, bestehend aus 1 Teil Acetanhydrid und 2 Teilen Triethylamin. Eine ausreichende Konzentration an Triethylamin war notwendig, um die basenkatalysierte Acetylierung in Gang zu bringen und um entstehende Essigsäure zu neutralisieren (Brooker 1982).

Die 6 ul Acetylierunglösung wurden jeder Probe mit Hilfe einer Konstriktionspipette direkt auf dem Whirlmix zugesetzt, so daß sofort eine vollständige Durchmischung erreicht werden konnte. Für die Doppelbestimmung wurde aus jeder Probe 2*100 ul der acetylierten Lösung entnommen und in Polypropylenröhrchen überführt. Gefriergetrocknetes Kaninchen-Serum wurde nach Vorschrift in Wasser gelöst und zu einer nach Gebrauchsanweisung mit Wasser verdünnten Lösung von Succinyl-cAMP-Tyrosinmethylester ^{125}I gegeben. Die so hergestellte Lösung enthielt in 11 ml 0,75 uCi ScAMP-TME^{125}I (spez. Aktivität 126,2 Ci/mmol), 1% Kaninchenserum und 0,05 M Natriumacetatpuffer pH 6,2. Von dieser Lösung wurde zu jeder Probe 100 ul pipettiert. Anschließend wurde der gefriergetrocknete cAMP-Antikörperkomplex gelöst und auch davon 100 ul zu jeder Probe gegeben.

Alle Proben wurden mit Hilfe des Whirlmix gut gemischt und 16-18 Stunden im Kühlschrank bei 2-4 °C inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden die Proben nach Zugabe von je 0.5 ml eiskaltem Präzipitator 15 min bei 0 °C mit ca. 3500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die im Polypropylenröhrchen noch anhaftenden Tropfen mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die Radioaktivität der abzentrifugierten Niederschläge wurde mittels eines automatischen Gamma-Counters je 1 min lang bestimmt.

3.4.5. Proteinbestimmung

Eine Proteinbestimmung war deshalb erforderlich, weil ein Bezug des gebildeten cAMP auf eine vorher eingesetzte Insel- oder Zellzahl schlecht möglich war.

3.4.5.1. Lowry-Proteinbestimmung modifiziert nach Peterson

Da die üblichen Proteinbestimmungsmethoden wie Lowry, durch Fällung mit TCA modifizierter Lowry (Empfindlichkeitsgrenze 35 ug) und "Mikro-Lowry" (Grenze 5 ug) zu unempfindlich sind, wurde ein nach Peterson modifizierter Lowry mit einer Nachweisgrenze von 1-2 ug verwendet.

Das Protein wurde mit DOC (Natriumdesoxycholat) und 72% TCA auch in sehr geringen Mengen quantitativ ausgefällt. Gleichzeitig sollten die meisten störenden Substanzen durch diesen Vorgang entfernt werden. Der Niederschlag wurde nun abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und eine alkalische (0,2 N NaOH) Kupfertartrat-/-carbonatlösung, die 2,5% SDS (Natriumdodecylsulfat) enthielt, zugegeben. Dadurch wurde das Pellet in Lösung gebracht, wobei SDS die sonst übliche Fällung nichtionischer und kationischer Detergentien verhinderte, die häufig bei der Untersuchung von Membranproteinen verwendet werden.

SDS beeinflußte den Test nicht, erlaubte eine sofortige Auflösung des Proteins in alkalischem Milieu und verhinderte Wechselwirkungen mit Lipiden.

Nach 10 min wurde ein Folin-Ciocalteau Phenolreagens (ca. 0,33 N) zugesetzt; dadurch ergab sich innerhalb von 30 min eine Blaufärbung, die im Photometer bei 750 Nanometer quantitativ bestimmt werden konnte.

3.4.5.2. Dye-Proteinbestimmung modifiziert nach Biorad

Da sich die Proteinbestimmung nach Peterson zwar als ausreichend empfindlich erwies, aber methodisch relativ aufwendig war und auch gelegentlich schwankende Ergebnisse erbrachte, wurde ab Anfang 1985 die methodisch einfachere Dye-Proteinbestimmung nach Biorad durchgeführt, die auf Bradford (1976) zurückgeht.
Der "Biorad protein assay", der von den Bio-Rad Laboratories (USA) vertrieben wird, basiert auf der Beobachtung, daß das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung von Coomassive Brillantblau G-250 sich von 465 nm nach 595 nm verschiebt, wenn eine Bindung an Protein stattfindet (Bradford 1976). So ergibt diese Dye-Bindungsmethode eine proteindosisabhängig genaue, aber nicht vollständig lineare Absorptionskurve.

Durchgeführt wurde der Test mit 180 ul der zu untersuchenden Lösung, zu der 20 ul einer 1 normalen Natronlauge gegeben wurde. Diese 200 ul wurden auf dem kochenden Wasserbad etwa 30 min erhitzt, um das vorhandene Protein in Lösung zu bringen. Nach Abkühlung wurden 800 ul des 1+3 verdünnten Dye-Farbreagens zugegeben. Da die höchste Stabilität des Dye-Proteinkomplexes zwischen 15 und 60 Minuten liegt, wurde die Absorptionsmessung bei 595 nm nach einer halben Stunde vorgenommen.
Parallel zu den Versuchsproben wurde bei jedem Test mit Rinderserumalbumin eine Verdünnungsreihe von 1-10 ug hergestellt, um Unterschiede von einer Bestimmung zur nächsten auszugleichen und somit reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Anhand der Eichkurve, die durch Auftragung der Extinktion gegen die Proteinkonzentration erhalten wurde, konnten die Versuchsproben genau ausgewertet werden (Abb. 3.1.).

Diese Vorgehensweise entsprach dem Microassay, der durch die geringe Verdünnung des Dye-Reagens eine von 20 ug auf 1 ug gesteigerte Empfindlichkeit aufwies.

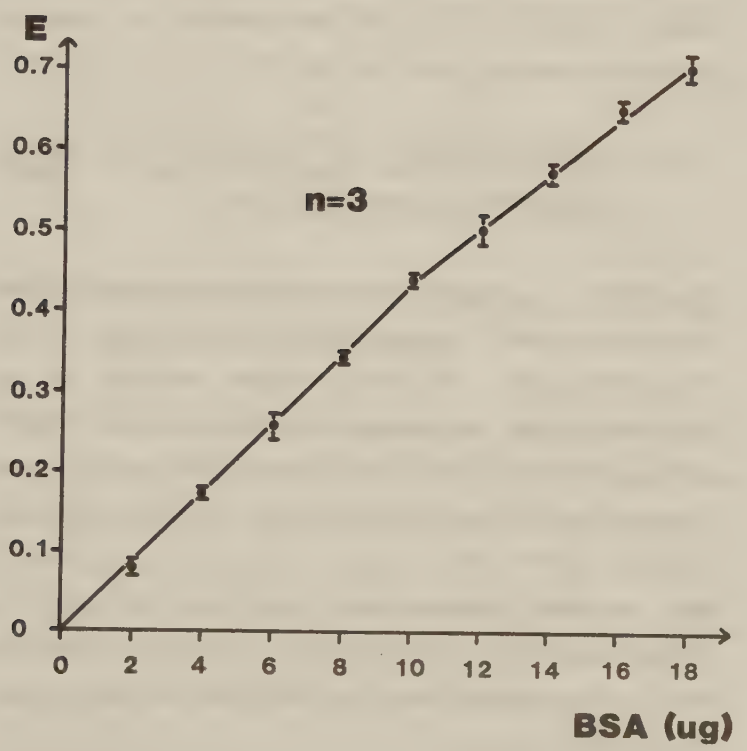

Abb. 3.1.: Eichkurve mit Rinderserumalbumin (BSA, 0-18 ug) für Dye-Proteinbestimmung modifiziert nach Biorad.

Die Anzahl der Versuche war 3; Mittelwerte +/- SEM.

3.4.6. Proteinbestimmungsresultate

Da zu Beginn der Arbeit mit der Lowry-Proteinbestimmung mod. nach Peterson gerbeitet wurde (Resultate bis 5.1.1.), anschließend aber auf die Dye-Proteinbestimmung mod. nach Biorad gewechselt wurde (Resultate ab 5.1.2.), mußte ein Vergleich der Sensitivität dieser Methoden gegenüber dem Membranprotein bzw. dem als Kontrolle verwendeten BSA durchgeführt werden.

3.4.6.1. Proteinbestimmungen aus Homogenaten und Membranpräparationen Langerhansscher Inseln

Wie Tabelle 3.1. zeigt, ergaben sich bei Versuchen mit groben Membranpräparationen Langerhansscher Inseln unter gleichen Versuchsbedingungen ganz unterschiedliche Resultate mit den Proteinbestimmungen nach Peterson und Biorad, wenn als Bezug die vorher eingesetzte Anzahl von Inseln gewählt wurde. Diese Ergebnisse waren in einer jeweils hohen Anzahl (n=15-26) von Versuchen reproduzierbar.

Weil in diesen Versuchen die Sensitivität von Biorad im Verhältnis zu Peterson etwa bei 1:5 lag, sind auch die Ergebnisse bis 5.1.1. in ihren Absolutwerten nicht direkt mit den Resultaten ab 5.1.2. vergleichbar.

Es zeigte sich weiterhin, daß die Proteinmenge in der Membranpräparation gegenüber dem Homogenat stark reduziert war. Das nachgewiesene Protein in Membranpräparationen war im Verhältnis zum Homogenatprotein bei Biorad (ca. 16.6%) nahezu gleich wie bei Peterson (ca. 15%).

Tab. 3.1.: Lowry-Proteinbestimmung (mod. nach Peterson) und Dye-Proteinbestimmung (mod. nach Biorad) aus Homogenaten und groben Membranpräparationen Langerhansscher Inseln der Ratte.

	Lowry-Proteinbest. (mod. nach Peterson) ug Protein/Insel	Dye-Proteinbest. (mod. nach Biorad) ug Protein/Insel
Homogenat	A 392.0 +/- 21.8 (26)	B 85.1 +/- 7.3 (15)
Membranpräp.	C 65.0 +/- 6.6 (21)	D 12.8 +/- 1.2 (17)

Anzahl der Versuche in Klammern; Mittelwerte +/- SEM.

t-Test: AB, CD: $p < 0.001$

3.4.6.2. Proteinbestimmungen aus Homogenaten und Membranpräparationen von RIN-A2-Zellen

Die Proteinbestimmungen an Homogenaten und Membranpräparationen von RIN-A2-Zellen wurden ausschließlich nach der Methode von Biorad durchgeführt. In Tabelle 3.2. wurden die erhaltenen Werte jeweils auf 1 Million Zellen bezogen.
Bei 2 bis 5 Millionen Zellen, die pro Versuch eingesetzt wurden, erhielt man also in der Membranpräparation ca. 33-83 ug Protein. Das Verhältnis Protein in der Membranpräparation zu Homogenatprotein lag bei RIN-A2-Zellen bei ca. 24.5% und damit etwas höher als bei Langerhansschen Inseln (16.6%, siehe 3.4.6.1.).

Tab. 3.2.: Dye-Proteinbestimmung modifiziert nach Biorad aus Homogenaten und groben Membranpräparationen von RIN-A2-Zellen.

	ug Protein/ 1 Million Zellen
Homogenat	A 67.3 +/- 5.0 (21)
Membranpräparation	B 16.5 +/- 1.3 (20)

Anzahl der Versuche in Klammern; Mittelwerte +/- SEM.

3.5. Versuchsauswertung

Aus den vom automatischen γ-Counter ermittelten Zählraten wurden für jede Doppelbestimmung die Mittelwerte gebildet und davon der Blank-Wert abgezogen. Der Blank-Wert gibt die Menge an Radioaktivität an, die beim Dekantieren des radioaktiven Überstandes durch Adsorption am Polypropylenröhrchen zurückbleibt.

Aus der Zählrate des Nullwertes der Eichkurve (B_o) und den Zählraten der cAMP-Standard-Verdünnungsreihe (B) wurde der Quotient B/B_o gebildet. Mit Hilfe eines Eichkurven-Plot-Programmes wurde auf dem Tischcomputer HP 9845B und dem angeschlossenen Plotter eine Eichkurve erstellt, deren Glättungsgrad variabel war. Nach Eingabe der Versuchsproben-Quotienten B/B_o wurde der dazugehörige cAMP-Wert an dieser Eichkurve errechnet und ausgedruckt.

Nach Einführung eines neuen γ-Counters mit PC-Anschluß konnte dieser Rechenschritt (Umrechnung der Zählraten in cAMP-Konzentrationen) mittels eines speziellen RIA-Programmes direkt am Counter durchgeführt werden. Zur Erstellung der Eichkurve wurde diejenige Methode verwendet, die keine lineare Regression

durchführte, sondern die Einzelpunkte durch "spline functions" verband, so daß eine relativ glatte Eichkurve resultierte.

Die auf diese Weise ermittelten cAMP-Werte mußten nun auf die Adenylatcyclase-Aktivität hochgerechnet werden, die ja mit pmol gebildetem cAMP pro Minute und pro Milligramm Protein angegeben wurde. Diese Umrechnung erfolgte mit Hilfe eines speziellen Basic-Rechenprogrammes auf dem Apple II Europlus PC. Die erforderlichen Daten, wie z.B. die Volumenverhältnisse im Test und RIA, die Gesamtproteinmenge und die Testdauer, mußten entsprechend dem Versuchsplan eingegeben werden.

3.6. Statistik

Alle angegebenen Werte stellen Mittelwerte +/- SEM dar, errechnet aus der in den Tabellen und Abbildungen angegebenen Anzahl (n) von Versuchen bzw. Proben.

Für die Berechnung signifikanter Unterschiede der Mittelwerte zweier Gruppen wurde der "Student's t-Test" oder der t-Test für Wertepaare verwendet, wenn es sich bei den Versuchsergebnissen um voneinander abhängige Einzelresultate handelte. D.h. Werte, die miteinander verglichen wurden, stammten aus dem gleichen Versuch. Damit wurde eine Verfälschung durch z.B. unterschiedliche Basalaktivität verschiedener Versuchstage vermieden.

Ein t-Test wurde als signifikant angesehen, wenn $p < 0.05$ war.

4. ERGEBNISSE DES METHODISCHEN TEILS

Im Gegensatz zur Bestimmung von cAMP-Spiegeln in intakten Zellen bzw. Inseln muß eine Messung der Adenylatcyclase-Aktivität in einem zerstörten Zellverband durchgeführt werden, der aber noch Zellmembranen mit dem intakten Enzymsystem enthält.
Diese Vorgehensweise hat gegenüber cAMP-Messungen in der intakten Zelle den entscheidenden Vorteil, daß intrazelluläre Einflüße auf den resultierenden cAMP-Spiegel weitgehend ausgeschlossen werden können, z.B. die Wirkung des cAMP-abbauenden Enzyms Phosphodiesterase.

Die Methodik zur Bestimmung der Adenylatcyclase-Aktivität in Zellmembranfraktionen Langerhansscher Inseln wurde im wesentlichen von U. Essig in der Zeit von 1980-1983 an diesem Lehrstuhl erstellt. Als Grundlagen dienten die von anderen Arbeitskreisen publizierten, meist etwas einfacheren Verfahrensweisen (Kuo 1973, Johnson 1974, Capito 1977, Valverde 1979, Sharp 1980).
Die von Essig erarbeiteten Teile sind mit (*) gekennzeichnet.

4.1. Gewinnung von Zellmembranen aus Langerhansschen Inseln bzw. RIN-A2-Zellen

4.1.1. Übersicht über die Techniken anderer Arbeitsgruppen

Publikation/ Autoren	Herstellung des Homogenates	Gesamthomogeant oder Membranpräparation
Rutten (1972)	Glas/Teflonhomogen.	Gesamthomogenat (Gesamtpankreas)
Kuo/Kuo (1973)	Glashomogenisator	Gesamthomogenat
Thompson (1976)	Glashomogenisator	Membranpräparation
Capito (1977)	Ultraschall	Gesamthomogenat
Thams (1982)	Ultraschall	Membranpräparation
Valverde (1979)	Potter-Elvehjem-tubes	Membranpräparation
Sharp (1980)	Ultraschall	Gesamthomogenat

Über Membranpräparationen aus RIN-Zellen existierten noch keine Publikationen.

4.1.2. Zur Gewinnung der Zellmembranfraktion

4.1.2.1. Gesamthomogenat oder Membranpräparation?

Vor der Messung der AC-Aktivität mußte abgewogen werden, ob das Gesamthomogenat verwendet oder ob eine Membranpräparation durchgeführt werden sollte, bzw. sogar ob eine Anreicherung von Plasmamembranen sinnvoll erschien (*).

a) Gesamthomogenat: Wird ein Gesamthomogenat verwendet, sind darin zwar sicher die gesamten Plasmamembranen und damit die gesamte AC-Aktivität sowie alle eventuell erforderlichen Faktoren enthalten, jedoch auch alle potentiell störenden Komponenten, insbesondere nach der Zerstörung der Kompartimentierung durch das Homogenisieren. Als störende Komponenten kommen dabei in Frage:

Phosphodiesterase (lösliche Form)

lösliche Phosphohydrolasen

lösliche Proteasen

b) grobe Membranpräparation: Eine grobe Membranpräparation (möglichst alle Membranen nach Abtrennen von Zellkernen und großen Trümmern) enthält den überwiegenden Teil der Plasmamembranen und damit fast die gesamte AC-Aktivität. Weitgehend abgetrennt sind die obengenannten störenden löslichen Komponenten. Ebenfalls abgetrennt sind unter Umständen auch für die AC-Aktivität erforderliche Faktoren, die dementsprechend im Testsystem wieder zugesetzt werden müssen. Die außer den Plasmamembranen enthaltenen Membranpartikel aus anderen Zellorganellen zeigen keine AC-Aktivität und keine PDE-Aktivität; sie senken zwar durch das in ihnen eingelagerte Protein die spezifische AC-

Aktivität, stören aber ansonsten wahrscheinlich nicht.

c) Anreicherung von Plasmamembranen: Eine Anreicherung speziell der Plasmamembranen ergibt eine höhere spezifische Aktivität und unter Umständen eine Abtrennung von Proteasen, die an die Membranen anderer Zellorganellen gebunden sind. Jedoch besteht die große Gefahr, daß bei dieser Prozedur auch ein Teil der Plasmamembranen verloren geht und somit eine nicht repräsentative Auswahl der Plasmamembranen für den Test verbleibt. Zudem stellt sich bei einer Membranpräparation aus Langerhansschen Inseln immer das Problem einer sehr geringen Menge an zur Verfügung stehendem Material. Wird die Ausbeute durch mehrmalige Anreicherungsschritte noch weiter verringert, so wird man bald in den Bereich einer nicht mehr exakt messbaren AC-Aktivität gelangen.

Die Schlussfolgerung aus diesen Überlegungen war, daß eine grobe Membranpräparation für die AC-Aktivitätsmessung in Langerhansschen Inseln am besten geeignet war.

4.1.2.2. Herstellung des Homogenates

Ein Homogenat aus Inselzellen kann auf verschiedene Weise hergestellt werden (*):

a) Glas-Glas-Homogenisatoren: Bei Verwendung von Glas-Glas-Homogenisatoren erhält man zwar gut geeignete Membranpartikel, erleidet jedoch unter Umständen erhebliche Verluste durch Adsorption. Dabei besteht die Gefahr der Selektion einer nicht repräsentativen Auswahl von Membranteilen bzw. anderer Komponenten.

b) Glas-Teflon-Homogenisatoren: Geringere Verluste erleidet man bei der Verwendung von Glas-Teflon-Homogenisatoren, die ebenfalls gut geeignete Membranpartikel liefern.

c) Ultraschall: Wird das Homogenat durch Ultraschall erzeugt, besteht dagegen die Gefahr einer starken Vesikelbildung.

d) Lyophilisation: Die Anwendung einer Lyophilisation erschien deshalb nicht geeignet, weil nach Ross/Gilman (1980) die N-Proteine der Adenylatcyclase empfindlich auf das Erwärmen nach der Lyophilisation reagieren.

e) Ultraturrax: Die Herstellung des Homogenates mit Hilfe eines Polytron bzw. Ultraturrax liefert bei richtiger Drehzahl und Einsatzdauer gut geeignete Membranpartikel, die wenig zur Vesikelbildung neigen.

Die Messung der AC-Aktivität mit zu Vesikeln geschlossenen Membranpartikeln sollte unbedingt vermieden werden, da aufgrund des strukturellen Aufbaus der Adenylatcyclase mit Rezeptor-

Einheiten an der Plasmamembranaußenseite und katalytischer Einheit bzw. N-Proteinen an der Innenseite (siehe Schema 1) bei Vesikeln immer nur die Außenseite zugänglich für die im Testmedium befindlichen Zusätze ist.
Somit gelangt bei "right-side-out" Vesikeln das Substrat z.B. nicht an die katalytische Einheit, bei "inside-out" Vesikeln entfällt weitgehend die Regulation durch die Besetzung der Rezeptoren.

Als Konsequenz daraus sollte das Homogenat durch Benutzung von Polytron- oder Glas-Teflon-Homogenisatoren hergestellt werden, wenn intakte flächige Membranpartikel erzeugt werden sollen, ohne daß ein Teil dabei verloren geht.

Nach der Herstellung des Homogenats wurde von Schritt zu Schritt die Osmolarität der verwendeten Medien etwas verringert, um gerade beim Einbringen der Membranpartikel in das folgende Medium ein Schließen der Membranen zu Vesikeln zu vermeiden.

Um einen Nachweis über die Intaktheit und Eignung der Membranen zu führen, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der Membranpräparation durchgeführt (*). Bei 40 000facher Vergrößerung erschienen überwiegend flächige Membranteile und nur sehr wenige Vesikel.

Zusätzlich wurde zur Verringerung der Proteasenaktivität beim Homogenisieren und bei allen folgenden Schritten der Proteasenhemmstoff PMSF zugesetzt. Um mögliche oxidative Einflüsse (z.B. durch Luftsauerstoff) zu vermindern, erfolgte in der Regel der Zusatz des Reduktionsmittels DTT.

4.1.2.3. Isolation der Membranpartikel

Für die Isolation der Membranpartikel standen 2 Techniken zur Verfügung (*):

a) Ultrazentrifugen-Pellet: Das Pelletieren am Boden eines Ultrazentrifugen-Röhrchens erbringt die Vorteile, daß kaum Verluste auftreten, daß gut zu erkennen ist, wo sich die Membranen befinden, und daß keine weiteren unerwünschten Zusätze erforderlich sind. Allerdings werden die Membranen bei den hohen Umdrehungszahlen aufeinandergepreßt, so daß eine Resuspension durchgeführt werden muß.

b) Gradienten-Zentrifugation: Eine Verdichtung der Membranen zu einem Pellet tritt dagegen bei einer diskontinuierlichen Gradientenzentrifugation mit Sucrose oder Ficoll nicht auf. Somit kann auch auf eine Resuspension verzichtet werden. Nachteile dieser Verfahrensweise sind, daß bei der Verwendung der geringen Materialmengen aus einer Inselpräparation optisch nicht zu erkennen ist, wo sich die Membranen befinden. Zudem macht die eventuelle Störung durch Zusatz des Gradienten (Osmolarität) dessen Beseitung erforderlich, und möglicherweise werden die Membranpartikel auch in mehrere Fraktionen aufgetrennt.

Daraus wurde geschlußfolgert, daß das Pelletieren der Membranpartikel bei sehr hohen g-Zahlen die geeignetere Verfahrensweise darstellt.

4.2. Untersuchungen zum in-vitro Testsystem der AC-Aktivitätsmessung

Bei einer groben Membranpräparation wird (wie bereits geschildert) durch die Zerstörung des physiologischen Zellmilieus zumindest der Zusatz der für die Funktion der Adenylatcyclase notwendigen Substrate erforderlich (genaue Auflistung siehe 2.4.3.). Da über die Verwendung und die einzusetzende Konzentration zahlreicher Substrate in der Literatur widersprüchliche Angeben zu finden waren, wurden eigene Untersuchungen zur Optimierung des Testsystems durchgeführt.

4.2.1. Phosphodiesterasehemmstoffe

Von der Adenylatcyclase gebildetes cAMP wird in der Zelle durch Phosphodiesterasen, die sowohl in löslicher Form als auch in membrangebundener Form vorliegen, abgebaut. Da zwar bei einer groben Membranpräparation die lösliche Form der Phosphodiesterase weitgehend abgetrennt wird, das membrangebundene Enzym aber in den Test mit eingebracht wird, kann bei AC-Aktivitätsmessungen ein Abbau von gebildetem cAMP durch Phosphodiesterasen erwartet werden. Diese unerwünschte Senkung der cAMP-Spiegel wird durch Zusatz eines Phosphodiesterasehemmstoffes verringert.
Als geeignet für diesen Zweck erwiesen sich die methylierten Xanthinderivate; als potentester PDE-Inhibitor gilt das Isobutylmethylxanthin (IBMX), das u.a. von der Arbeitsgruppe um W.J. Malaisse eingesetzt wurde (Valverde et al. 1979; Leclerq-Meyer et al. 1980). Da diese Substanz aber bei Bestimmung der cAMP-Spiegel

mittels eines Radioimmunoassays störend wirken kann, wurde von anderen Arbeitskreisen das Theophyllin bzw. sein lösliches Analogon Aminophyllin (Theophyllin-Ethylendiamin) verwendet (Johnson et al. 1974; Kuo et al. 1973), das zwar die PDE nicht vollständig aber doch in ausreichendem Maße zu blockieren vermag. (cross-reactivity für Theophyllin laut cAMP-RIA-Manual < 0.0001%).

Um über den Einsatz dieses Stoffes zu entscheiden, wurden Versuche ohne und mit 1 mM Aminophyllin durchgeführt (*). Dabei ergaben die Experimente mit dem PDE-Hemmstoff eine AC-Aktivität von 7.5 +/- 0.5 pmol cAMP/mg min (n=12) gegenüber 4.4 +/- 0.4 (n=4) ohne Zusatz von Aminophyllin. Diese Steigerung war signifikant ($p<0.01$).

Eine Erhöhung der Konzentration von 1 mM auf 1.5 mM brachte allerdings keine weitere Steigerung der AC-Aktivität.

Somit wurde in allen weiteren Tests 1 mM Aminophyllin zugesetzt.

4.2.2. Konzentration von ATP; ATP-regenerierendes System

Durch das Verfahren der Membranpräparation wurde dem membrangebundenen AC-System auch das physiologischerweise im Cytosol befindliche Ausgangssubstrat ATP entzogen und mußte demzufolge im Testmedium wieder zugesetzt werden.

Die Palette der in Publikationen über AC-Aktivitätsmessungen eingesetzten Konzentrationen reichte dabei von 13 uM (Valverde et al. 1979) über 1 mM (Kuo et al. 1973) bis zu 3 mM ATP (Capito et al. 1977).

Um in den optimalen Konzentrationsbereich zu gelangen, wurden Messungen mit 0.1, 1 und 2 mM ATP durchgeführt (*). Dabei

resultierten AC-Aktivitäten von 0.6 +/- 0.2 bei 0.1 mM (n=12), 8.6 +/- 1.1 bei 1 mM (n=15) und 8.8 +/- 0.8 pmol cAMP/mg min bei 2 mM ATP (n=21). Eine signifikante Steigerung ($p<0.001$) war von 0.1 gegenüber 1 mM ATP zu ermitteln, während zwischen 1 und 2 mM keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten.
Um eine vollständige Enzymaktivität ohne zu großen Substratüberschuß zu erhalten, wurde in der Folgezeit mit 1 mM ATP gearbeitet.

Da von den meisten Arbeitsgruppen (wie bei Membranpräparationen aus anderen Geweben üblich) ein ATP-regenerierendes System zugesetzt wurde (Sharp et al. 1980: Creatinkinase + Phosphokreatin, ebenso Thams et al. 1982 und Leclerq et al. 1980; Kuo et al. 1973: Pyruvatkinase + Phosphoenolpyruvat), mußte auch die Notwendigkeit dieser Substratzusätze untersucht werden.
Zu diesem Zweck wurden Messungen definierter ATP-Mengen in Anwesenheit steigender Volumina der Membranpräparation mit Hilfe des Du Pont Luminescence Biometers durchgeführt (*). Die Wiederfindungsrate von ATP in einer groben Membranpräparation Langerhansscher Inseln lag im Durchschnitt bei 96% (n=10) und bewegte sich zwischen 89 und 103%.
Aus diesen Daten war zu ersehen, daß der Aktivität der Nukleotidpyrophosphatase, die ATP zu AMP und Pyrophosphat abzubauen vermag, zumindest in einer groben Membranpräparation aus Langerhansschen Inseln nicht die Bedeutung zukommt wie in Membranpräparationen z.B. aus Leberzellen mit ihrem höherem Stoffumsatz an ATP.
Aus diesem Grunde wurde auf die Verwendung eines ATP-regenerierenden Systems verzichtet.

Eine Hemmung der Nukleotidpyrophosphatase wurde allerdings zum Teil auch durch den Zusatz von EDTA erreicht, das in der Lage ist, Metallionen abzufangen, die von diesem Enzym benötigt werden.

Daß eine Anhebung der ATP-Konzentrationen jedoch nicht so ohne weiteres möglich war, ergab sich aus Untersuchungen, die eine mögliche "cross reactivity" des ATP gegenüber dem zu bestimmenden cAMP im Radioimmunoassay aufzeigen sollten.

Die "cross reactivity" von ATP wurde im cAMP-RIA-Manual mit < 0.01% angegeben. Da die Tests zunächst ATP in einer Konzentration von 1 mM enthielten, und diese bis zum RIA noch 1 : 2.5 verdünnt wurden, betrug die Endkonzentration von ATP im RIA 0.4 mM. Wenn von einer "cross reactivity" von 0.01% ausgegangen wurde, bedeutete dies, daß die in 100 ul enthaltenen 40 nmol ATP ca. 4 pmol cAMP entsprachen bzw. vortäuschten.

Wenn auf die vorherige Ausfällung des ATP durch Zinkcarbonat verzichtet wurde, war dieser Sachverhalt (ATP-dosisabhängige Abnahme der Counts) sowohl bei acetylierter als auch bei nicht acetylierter Durchführung des Assays tatsächlich zu beobachten (nicht dargestellt). Bereits bei 1 mM ATP war eine deutliche Interferenz des ATP mit dem cAMP-spezifischen Antikörper festzustellen, die bei 10 mM ATP in noch stärkerem Maße auftrat.

Um die Störwirkung des ATP zu beseitigen, wurde in der Literatur nach Lösungsmöglichkeiten für dieses Problem gesucht. Bereits 1973 wurde von Cooper et al. eine Methode zur Abtrennung überschüssiger nichtzyklischer Nukleotide mittels einer Bariumacetatfällung beschrieben. Thams et al. wandten dieses Prinzip 1982 bei AC-Aktivitätsmessungen in Homogenaten Langerhansscher Inseln an,

indem sie durch Zinkcarbonatfällung eine Abtrennung des ATP zu erhalten versuchten.

Diese Verfahrensweise wurde seit Anfang 1984 übernommen, ohne allerdings eine vollständige Abtrennung des störenden ATP zu erreichen. Weitere Verbesserungen dieser Technik sind also evtl. noch erforderlich.

4.2.3. Wiederfindungsrate von cAMP im RIA

Um die Zuverlässigkeit der cAMP-Bestimmungsmethode mittels Radioimmunoasssay zu überprüfen, wurde von Beginn der Untersuchungen an in jedem Experiment mehreren Leerwerten eine definierte Menge an cAMP-Standard zugesetzt. Die nach der Auswertung mit RIA ermittelten Mengen wurden in Relation zum Ausgangswert gesetzt: So ergaben sich zunächst durchschnittliche Recovery-Werte von 55.3% +/- 2.7% (n=12) (*). Der Zusatz von cAMP-Recovery zu Proben mit Membranpräparation hatte keinen Einfluß auf die AC-Aktivität. Später wurden bei acetylierter Durchführung des RIA Recovery-Werte von 70.9% +/- 4.4% ermittelt (n=9).

Da Substanzen, die im Testmedium enthalten waren (v.a. ATP, s.o.), eine Verschiebung der cAMP-Standard-Eichkurve bewirken konnten, außerdem durch die Aufarbeitung der Proben möglicherweise ein Teil des cAMP verlorenging, wurden daraufhin die Eichkurven unter genau den gleichen Testzusätzen wie die Versuchsproben hergestellt und ebenso behandelt, d.h. 30 Minuten inkubiert, 3 Minuten erhitzt etc.

Danach ergaben sich Recovery-Werte, die zwischen 87 und 132% lagen, mit einem Mittelwert von 111.1% +/- 6.0% (n=10).

4.2.4. Konzentration von GTP

GTP ist als Aktivator der Nukleotid-bindenden Proteine (N_s- und N_i-Proteine) auch für die Basalaktivität des Adenylatcyclase-Systems von Bedeutung und sollte zumindest bei Untersuchungen von Substanzen, die außerhalb der katalytischen Einheit an der Adenylatcyclase angreifen, dem Testmedium zugesetzt werden.

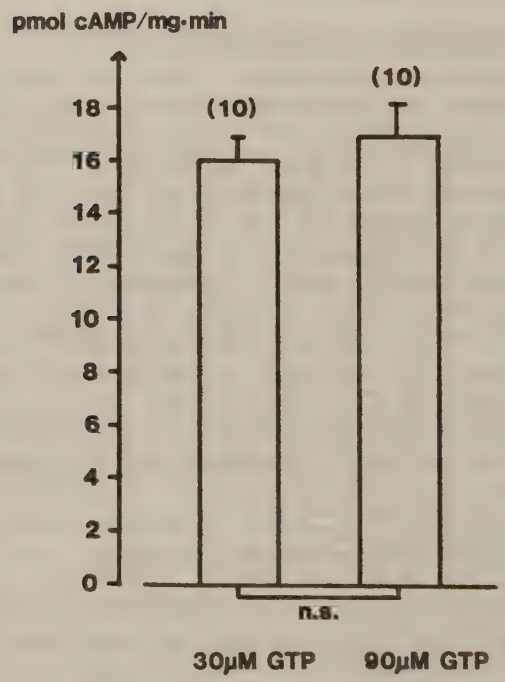

Abb. 4.1.: Einfluß von GTP (30 und 90 uM) auf die Basalaktivität der AC in groben Membranpräparationen Langerhansscher Inseln der Ratte.

Proteinbest. nach Peterson; Anzahl der Proben aus 3 Versuchen in Klammern; Mittelwerte +/- SEM, angegeben in pmol gebildetes cAMP pro mg Protein pro min; t-Test für Wertepaare

Über die zu verwendende Dosis lagen in der Literatur unterschiedliche Daten vor: Johnson et al. (1974) setzten 10-20 uM GTP ein, während Kuo et al. (1973) 5 uM GTP verwendeten.

Die ersten AC-Tests wurden mit 30 uM GTP begonnen (*). Nun sollte untersucht werden, ob z.B. 90 uM GTP (ohne Zusatz eines Stimulators) eine deutliche Veränderung der Basalaktivität erzeugen konnte.

Die Zunahme um 0.9 pmol cAMP/mg min bei 90 uM GTP gegenüber 30 uM GTP fiel aber gering aus und war nicht signifikant (Abb. 4.1. und Tab. 4.1.).

Die Konzentration von GTP wurde demzufolge bei 30 uM belassen.

Tabelle 4.1.: Einfluß von GTP (30 und 90 uM) auf die Basalaktivität der AC in groben Membranpräparationen Langerhansscher Inseln der Ratte.

GTP (uM)		pmol cAMP/mg Protein min
30	A	16.0 +/- 0.9 (10)
90	B	16.9 +/- 1.1 (10)

Proteinbest. nach Peterson; Anzahl der Proben aus 3 Versuchen in Klammern; Mittelwerte +/- SEM

t-Test für Wertepaare: AB: n.s. ($p<0.1$)

4.2.5. Konzentration von DTT

Das Antioxidans Dithiotreitol (DTT) wurde i.A. bereits zum Homogenatpuffer zugesetzt, da ihm eine protektive Wirkung gegenüber den Membranpartikeln und der Adenylatcyclase zugeschrieben wird.

Von Valverde et al. (1979) wurde DTT beim AC-Test in einer

Konzentration von 0.6 mM eingesetzt, während Sharp et al. (1980) 1 mM verwendeten.

Eigene Untersuchungen zeigten, daß eine DTT-Konzentration von 1 mM als Oxidationsschutz ausreichend war, da eine Erhöhung auf 2 mM DTT keine signifikante Beeinflußung der Basalaktivität ergab. (1 mM DTT 16.7 vs. 16.4 pmol cAMP/mg min mit 2 mM DTT)

Weitere Untersuchungen zur Wirkung von DTT siehe 5.2.3.

4.2.6. Zeitlinearität des AC-Tests

Um überhaupt Aussagen über die Wirkung von bestimmten Substanzen auf die Adenylatcyclase treffen zu können, mußte zunächst gesichert sein, daß das Enzym über einen gewissen Zeitraum gleichmäßig aktiv blieb. Da die Zeitdauer von AC-Aktivitätsmessungen entweder in Homogenaten oder Membranpräparationen Langerhansscher Inseln von 10 min (Kuo et al. 1973), 20 min (Leclerq-Meyer 1980; Sharp et al. 1980) bis zu 60 min (Thams et al. 1982) variierte, wurden eigene Untersuchungen zur Zeitlinearität über 10, 20, 30 und 60 min durchgeführt (Tab. 4.2.). Dabei resultierte eine lineare AC-Aktivität von 10 min bis zu 60 min Testdauer, die allerdings nicht durch den Nullpunkt verlief (Abb. 4.2.). Dies kann auf die beobachtete "cross-reactivity" von ATP in diesen Versuchen zurückgeführt werden (vgl. 4.2.2.).

Eine gleichbleibende Aktivität der Adenylatcyclase über mindestens 75 min wurde auch von Thams et al. (1982) festgestellt.

Um gut messbare cAMP-Spiegel zu erhalten, wurde die Zeitdauer bei 30 min belassen.

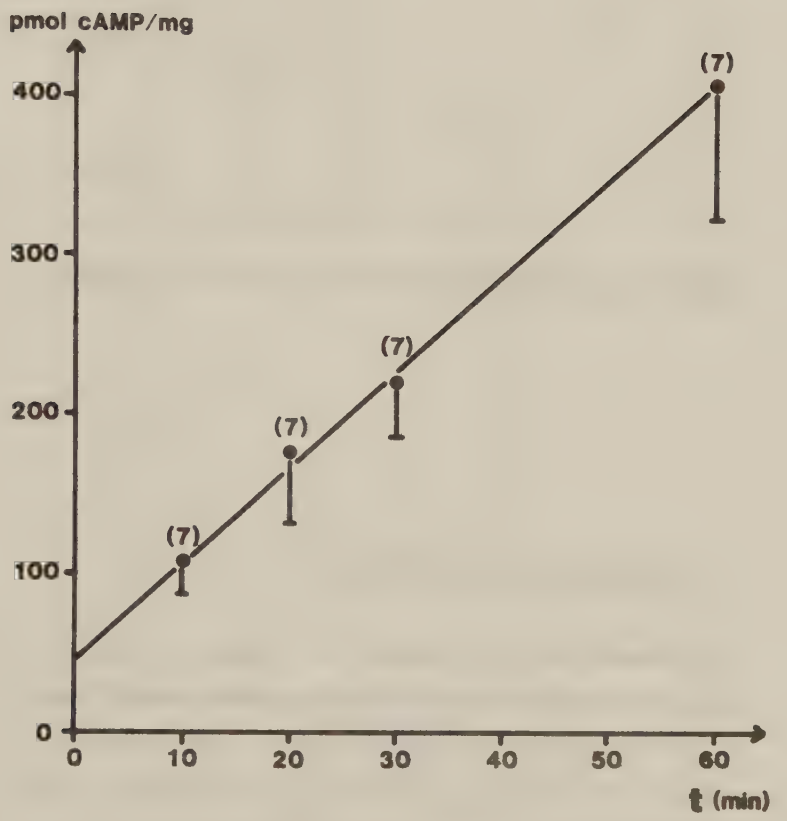

Abb. 4.2.: Zeitlinearität der AC-Aktivität in groben Membranpräparationen Langerhansscher Inseln der Ratte (10, 20, 30 und 60 min).

Proteinbest. nach Peterson; Anzahl der Proben aus 5 Versuchen in Klammern; Mittelwerte +/- SEM, angegeben in pmol gebildetes cAMP pro mg Protein

Tabelle 4.2.: Zeitlinearität der AC-Aktivität in groben Membranpräparationen Langerhansscher Inseln der Ratte.

Zeit (min)	pmol cAMP/mg Protein	
10	107.3 +/- 22.8	(7)
20	176.6 +/- 45.5	(7)
30	220.9 +/- 36.2	(7)
60	408.4 +/- 86.0	(7)

Proteinbest. nach Peterson; Anzahl der Proben aus 5 Versuchen in Klammern; Mittelwerte +/- SEM

4.2.7. Stimulation mit Natriumfluorid

Zur Sicherstellung der Intaktheit des Enzym- und Testsystems wurde dem Testpuffer Natriumfluorid als bekanntermaßen starker und zuverlässiger Stimulator des N_s-Proteins (siehe Schema 1.8.) zugesetzt (ein direkter Einfluss des Natriumfluorids auf die katalytische Einheit kann aber nicht ausgeschlossen werden).

Natriumfluorid (10 mM) bewirkte eine Aktivierung der Adenylatcyclase ca. um den Faktor 3.5 (Abb.4.3. und Tab. 4.3.). Diese Steigerung war signifikant ($p<0.01$).

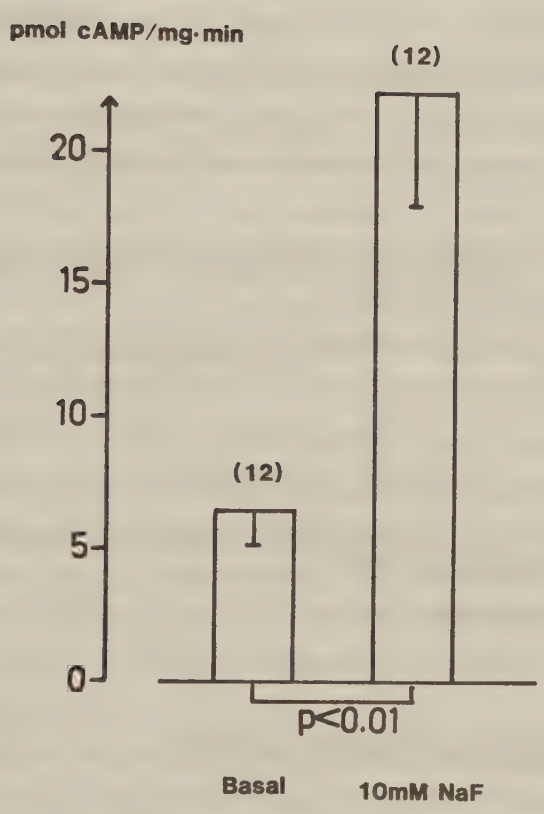

Abb. 4.5.: Einfluß von Natriumfluorid (10 mM) auf die AC-Aktivität in groben Membranpräparationen Langerhansscher Inseln der Ratte.

Proteinbest. nach Peterson; Anzahl der Proben aus 5 Versuchen in Klammern; Mittelwerte +/- SEM, angegeben in pmol gebildetes cAMP pro mg Protein und min; t-Test für Wertepaare

Da von anderen Arbeitsgruppen eine NaF-Stimulation in ähnlicher Grössenordnung gefunden wurde (Valverde et al. 1979: 7.2 pmol cAMP/mg min mit 10 mM NaF gegenüber 1.2-2.3 pmol cAMP/mg min Basalwert; Capito et al. 1977: Steigerung von 11 pmol cAMP/mg min (basal) auf 27 pmol cAMP/mg min mit 10mM NaF), konnte zumindest der Schluß gezogen werden, daß ein funktionsfähiges Enzym im Test vorlag, das sensibel auf Veränderungen des Testmilieus reagierte.

Tabelle 4.3.: Einfluß von Natriumfluorid (10 mM) auf die AC-Aktivität in Membranpräparationen Langerhansscher Inseln der Ratte.

NaF (mM)		pmol cAMP/mg Protein min
0	A	6.5 +/- 1.3 (12)
10	B	22.3 +/- 4.3 (12)

Proteinbest. nach Peterson; Anzahl der Proben aus 5 Versuchen in Klammern; Mittelwerte +/- SEM

t-Test für Wertepaare: AB: $p < 0.01$

4.2.8. Durchführung des AC-Tests mit (^{32}P)ATP.

Da die Auswertung der AC-Aktivtäts-Tests mittels eines kommerziellen RIA-Kits keineswegs die einfachste und kostengünstigste Methode der cAMP-Bestimmung darstellte, wurde auch eine andere Bestimmungsmethode erprobt.

Salomon et al. beschrieben bereits 1974 einen "highly sensitive adenylate cyclase assay", der nach dem Prinzip funktioniert, daß im Überschuß zugesetztes, am Phosphor radioaktiv markiertes ATP von der Adenylatcyclase in messbare Mengen von radioaktivem

(^{32}P)cAMP umgewandelt wird, das über Säulen von Dowex Kationenaustauscherharz und Aluminiumoxid vom Ausgangsstoff ATP getrennt werden kann.

Um diese Methodik zu untersuchen, wurde ein Versuchsansatz nach diesem Testprinzip durchgeführt. Der Teststart erfolgte durch Zugabe von 20ul (^{32}P)ATP zu je 40 ul Testpuffer und Membranpräparation; nach 30 min beeendete der Zusatz von 150 ul Stoppuffer (2.7 mM cAMP, 2.7 mM ATP und 1.3% Natriumdodecylsulfat = SDS) den Test. Nach Reinigung über 2 Chromatographiesäulen (1.Säule: Dowex; 2.Säule: Aluminiumoxid) konnten die Testansätze im ß-Counter gezählt werden.

Ergebnisse: Obwohl vergleichsweise (zu AC-Messungen bei Paramecei) hohe Aktivitäten von (^{32}P)ATP eingesetzt wurden, ergaben sich kaum messbare (^{32}P)cAMP-Werte. Sowohl die basalen als auch die durch Natriumfluorid stimulierten Werte errreichten nicht wesentlich mehr als den doppelten Blindwert, waren erheblichen Schwankungen unterworfen und liessen somit keine Aussagen zu.

Daraus war die Schlussfolgerung zu ziehen, daß diese Methodik für die AC-Aktivitätsmessung mit den geringen zur Verfügung stehenden Mengen einer Membranpräparation aus Langerhansschen Inseln nur mit starken Einschränkungen zur Verwendung gelangen konnte.

Diese gegenüber der cAMP-Bestimmung mit RIA einfachere Methode mit (^{32}P)ATP käme allerdings bei weiteren AC-Aktivitätsmessungen in einer groben Membranpräparation aus Ratteninsulinoma-Zellen in Frage.

5. V E R S U C H S E R G E B N I S S E

5.1. AC-Aktivität Langerhansscher Inseln

5.1.1. Stimulation der AC-Aktivität

Zunächst wurden Versuche zur Stimulation der AC unternommen. Neben Natriumfluorid (siehe 4.2.7.) wurden Forskolin und GppNHp eingesetzt.

5.1.1.1. Einfluß von Forskolin: Dosis-Wirkungskurve

Da an intakten Langerhansschen Inseln von Ratten eine dosisabhängige Steigerung der cAMP-Spiegel nach Zusatz von Forskolin festgestellt wurde (Müller 1985), mußte die Übertragbarkeit dieses Effektes auf eine Membranpräparation untersucht werden. Es sollte ermittelt werden, ob diese Wirkung des Forskolins (wie an anderen Geweben nachgewiesen) durch eine direkte Stimulation der Adenylatcyclase zustande kam.

Um den Konzentrations-Wirkungsbereich von Forskolin herauszufinden, wurde das Diterpen in Konzentrationen von 0-100 uM eingesetzt. Wie in Abb. 5.1. zu sehen, führte dies zu einer dosisabhängigen Zunahme der AC-Aktivität.

Bereits bei 1 uM Forskolin war die Zunahme gegenüber der basalen AC-Aktivität von 1.4 auf 3.5 pmol cAMP/mg min signifikant (Tab. 5.1.).

Bei einer Konzentration von 100 uM wurde die AC-Aktivität ca. um das 14fache gesteigert.

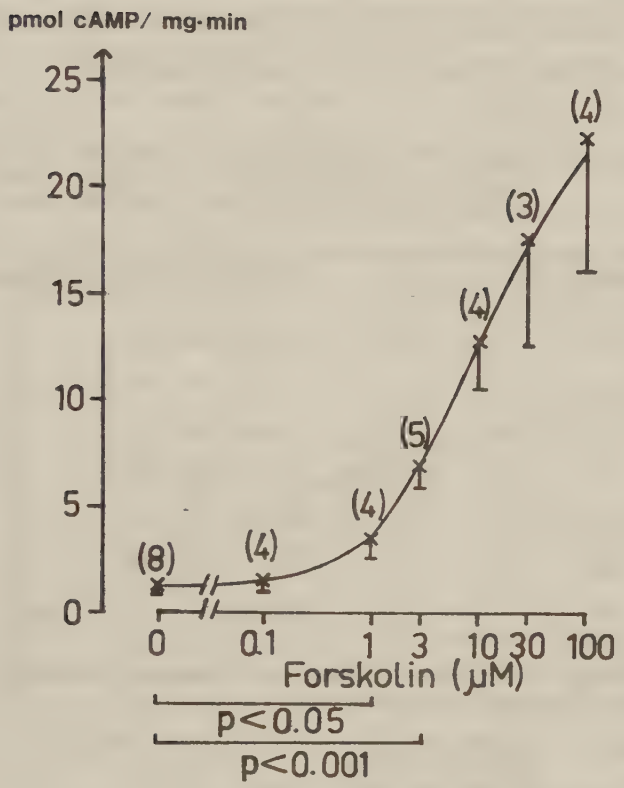

Abb. 5.1.: Einfluß von Forskolin (0.1 - 100 uM) auf die Aktivität der Adenylatcyclase in groben Membranpräparationen Langerhansscher Inseln der Ratte.

Proteinbest. nach Peterson; Anzahl der Proben aus 4 Versuchen in Klammern; Mittelwerte +/- SEM, angegeben in pmol gebildetes cAMP pro mg Protein und min; t-Test

Da aufgrund von Löslichkeitsproblemen Forskolin nicht in höheren Konzentrationen als 100 uM eingesetzt werden konnte, wurde auch keine maximale Stimulation (Abflachungsphase der Dosis-Wirkungskurve) erreicht. Aus diesem Grunde ließ sich die EC_{50} nur grob auf einen Wert von ca. 10 uM Forskolin festlegen.

Tabelle 5.1.: Einfluß von Forskolin (0.1 - 100 uM) auf die Aktivität der Adenylatcyclase in groben Membranpräparationen Langerhansscher Inseln der Ratte.

Forskolin (uM)		pmol cAMP/mg Protein min
0	A	1.4 +/- 0.4 (8)
0.1	B	1.5 +/- 0.4 (4)
1	C	3.5 +/- 0.9 (4)
3	D	6.9 +/- 0.8 (5)
10	E	12.9 +/- 2.2 (4)
30	F	17.4 +/- 5.0 (3)
100	G	19.6 +/- 6.4 (4)

Proteinbest. nach Peterson; Anzahl der Proben aus 4 Versuchen in Klammern; Mittelwerte +/- SEM

t-Test: AB: n.s.
AC: $p < 0.05$
AD, AE, AF, AG: $p < 0.001$

5.1.1.2. Einfluß von GppNHp: Dosis-Wirkungskurve

Wie von anderen Geweben bekannt, führt der Zusatz steigender Dosen von GTP zu einer Stimulation des N_S-Proteins und damit zu einer Erhöhung der AC-Aktivität. Eine im Vergleich zu GTP noch etwas stärkere Wirkung entfaltet in dieser Hinsicht das GTP-Analogon GppNHp, das von der N-Protein-gebundenen GTPase nicht

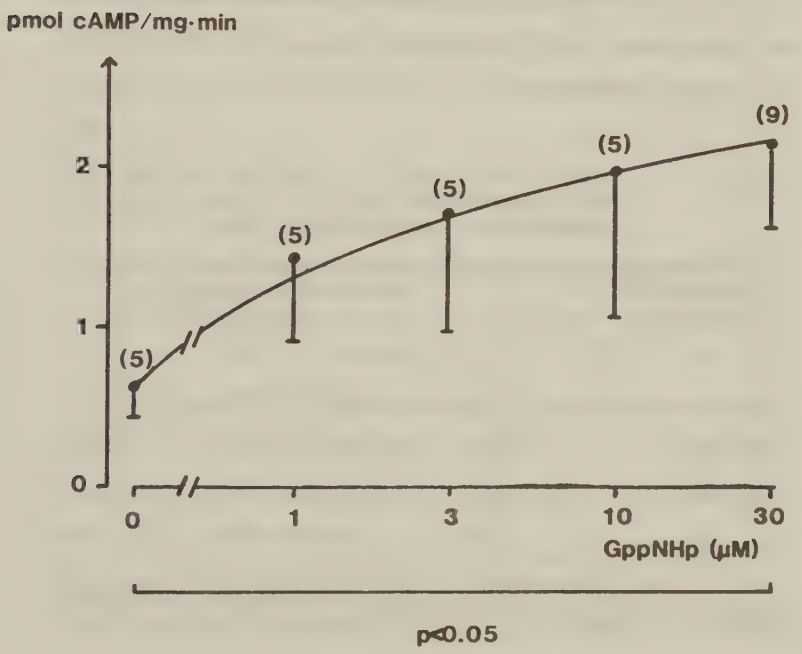

Abb. 5.2.: Einfluß von GppNHp (1 - 30 uM) auf die Aktivität der Adenylatcyclase in groben Membranpräparationen Langerhansscher Inseln der Ratte.

Proteinbestimmung nach Peterson; Anzahl der Versuche in Klammern; Mittelwerte +/- SEM, angegeben in pmol gebildetes cAMP pro mg Protein und min; t-Test

gespalten werden kann, und damit zu einer irreversiblen Stimulation des N_s-Proteins führt.

Wie in Abbildung 5.2 dargestellt, ergab sich mit steigender GppNHp-Konzentration eine Zunahme der AC-Aktivität, die bei 30 uM erstmals signifikant war.

Diese Stimulation der basalen AC-Aktivität von 0.6 auf 2.1 pmol cAMP/mg min durch 30 uM GppNHp war im Vergleich zum Effekt des Forskolins nur schwach ausgeprägt (Tab. 5.2.).

Von Interesse für die folgenden Versuche war auch, daß bis zu 10 uM GppNHp noch keine signifikante Zunahme der AC-Aktivität festgestellt werden konnte.

Tabelle 5.2.: Einfluß von GppNHp (1 - 30 uM) auf die Aktivität der Adenylatcyclase in groben Membranpräparationen Langerhansscher Inseln der Ratte.

GppNHp (uM)		pmol cAMP/mg Protein min
0	A	0.6 +/- 0.2 (5)
1	B	1.4 +/- 0.5 (5)
3	C	1.7 +/- 0.8 (5)
10	D	2.0 +/- 0.9 (5)
30	E	2.1 +/- 0.5 (9)

Proteinbestimmung nach Peterson; Anzahl der Versuche in Klammern; Mittelwert +/- SEM

t-Test: AB, AC, AD: n.s. ($0.1 < p < 0.3$)
AE: $p < 0.05$

5.1.2. Hemmung der AC-Aktivität; Einfluß von Thioloxidantien

Parallel zu dem 1984 von Malaisse et al. publizierten Nachweis des inhibitorischen N-Proteins der Adenylatcyclase in der Langerhansschen Insel wurden Untersuchungen zur Hemmbarkeit der AC-Aktivität in groben Membranpräparationen Langerhansscher Inseln durchgeführt. Dies wurde anhand der Wirkung von GppNHp auf die Forskolin-stimulierte AC-Aktivität untersucht.
Weiterhin wurden Versuche zur Wirkung von Thioloxidantien auf die basale, stimulierte und inhibierte AC-Aktivität angestellt, um festzustellen, an welchem Teil der AC sensible Thiolgruppen von Bedeutung sind.

5.1.2.1. GppNHp-induzierte Hemmung der Forskolin-stimulierten AC-Aktivität

Um die Hemmbarkeit der Adenylatcyclase in Langerhansschen Inseln der Ratte zu demonstrieren, wurde untersucht, ob eine bestimmte Konzentration von GppNHp in der Lage ist, die Forskolin-Stimulation zu verringern.
Diese Versuche wurden bei 25 °C unter Anwesenheit einer von 5 auf 2 mM reduzierten Magnesiumkonzentration durchgeführt, da unter diesen Bedingungen (laut Jakobs et al. 1984 und persönliche Mitteilungen) die über das N_i-Protein vermittelten Wirkungen besser zu erfassen sind (siehe 3.4.3.2.).

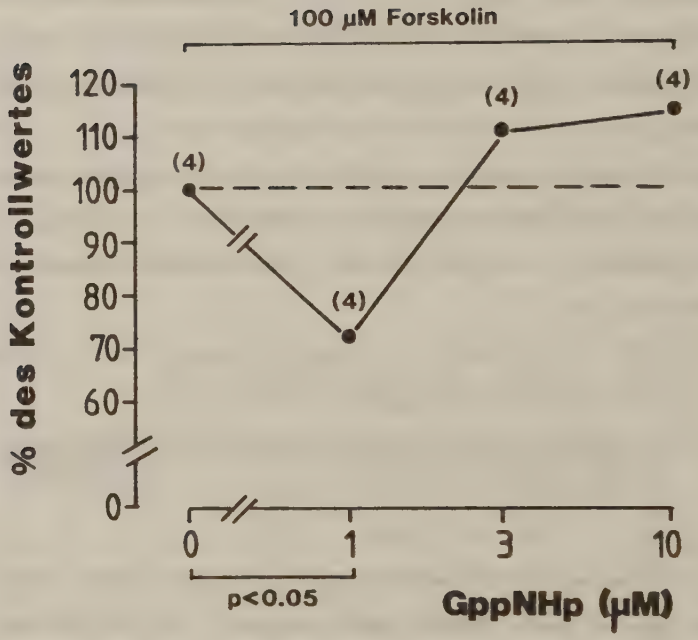

Abb. 5.3.: Einfluß von GppNHp (0-10 uM) auf die durch 100 uM Forskolin stimulierte AC-Aktivität in groben Membranpräparationen Langerhansscher Inseln der Ratte.

Inkubationstemperatur 25 °C; 2 mM $MgCl_2$;
Anzahl der Versuche in Klammern; mittlere Prozentwerte, bezogen auf den jeweiligen Versuchskontrollwert (=100%);
t-Test für Wertepaare

Zudem konnte diesen Versuchen das Antioxidans DTT nicht mehr zugesetzt werden, da diese Versuchserie gleichzeitig als Kontrolle für die Untersuchungen mit Diamid dienten (s. 3.4.3.3.).

Die in Abbildung 5.3. dargestellte Versuchsserie zeigt eine signifikante Hemmung der AC-Aktivität durch 1 uM GppNHp gegenüber dem Vergleichswert ohne Zusatz von GppNHp.

Die AC-Aktivität nahm von 71.3 (=100%; ohne GppNHp) auf 50.9 pmol cAMP/mg min (mit 1 uM GppNHp) ab (Tab. 5.4.).

Eine weitere Erhöhung der GppNHp-Konzentration erbrachte wieder einen Anstieg der AC-Aktivität.

5.1.2.2. Einfluß von Diamid auf die basale und Forskolin-stimulierte AC-Aktivität

Während das Thioloxidans Diamid in der intakten Insel keinen Einfluß auf die basalen cAMP-Spiegel hatte, vermochte es die Forskolin-Stimulation sogar noch zu potenzieren (Ammon/ Müller/ Trier 1985).

Um Aussagen über den möglichen Angriffspunkt von Diamid treffen zu können, mußten Untersuchungen am in-vitro-System der AC durchgeführt werden.

Auch bei diesen Versuchsreihen wurde unter den oben (3.4.3.3.) beschriebenen Bedingungen (also ohne DTT) gearbeitet. Die Testansätze enthielten zudem weder GTP noch GppNHp.

Ohne die Anwesenheit eines thiolregenerierenden Systems senkte 0.1 mM Diamid nach 10 minütiger Vorbehandlung sowohl die basale, als auch die mit 100 uM Forskolin stimulierte AC-Aktivität sehr deutlich (Abb. 5.4.).

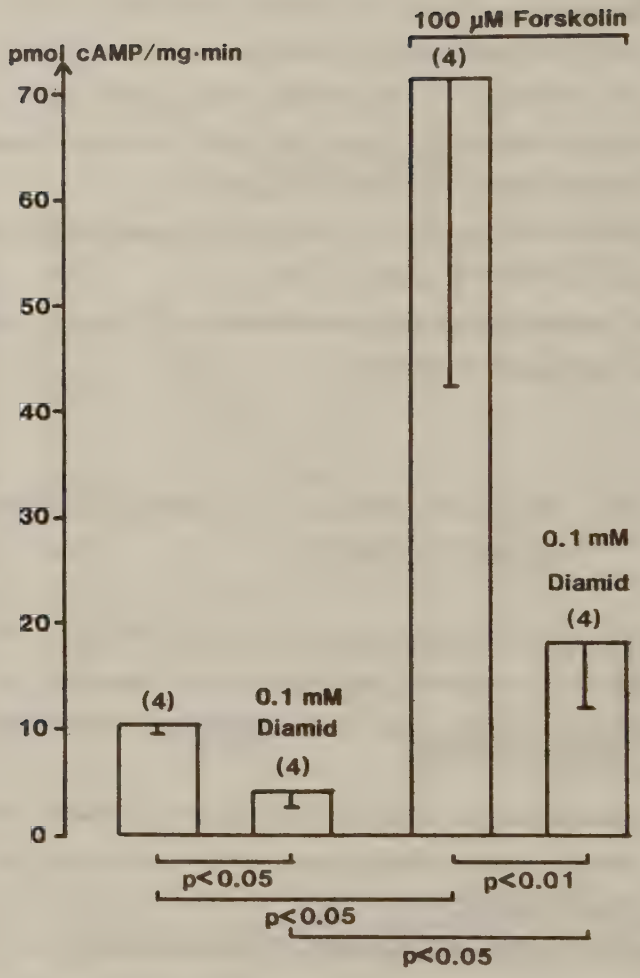

Abb. 5.4.: Einfluß von Diamid (0.1 mM) auf die basale und Forskolin-stimulierte AC-Aktivität in groben Membranpräparationen Langerhansscher Inseln der Ratte.

Inkubationstemperatur 25 °C; 2 mM $MgCl_2$;
Anzahl der Versuche in Klammern; Mittelwerte +/- SEM, angegeben in pmol gebildetes cAMP pro mg Protein und min; t-Test für Wertepaare

Wie aus Tabelle 5.3. zu ersehen ist, nahm durch den Zusatz von 0.1 mM Diamid die basale und Forskolin-stimulierte Aktivität auf ca. 25-40% ab.

Allerdings wurde die Forskolinstimulation durch das Thioloxidans nicht total blockiert, es war noch immer eine signifikante Stimulation durch 100 uM Forskolin um ca. das 4.5 fache festzustellen (BD in Tab. 5.3.).

Tab. 5.3: Einfluß von Diamid (0.1 mM) auf die basale und Forskolin-stimulierte AC-Aktivität in groben Membranpräparationen Langerhansscher Inseln der Ratte.

Diamid (mM)	Forskolin (uM)		pmol cAMP/mg Protein min
0	0	A	10.5 +/- 0.6 (4)
0.1	0	B	4.2 +/- 1.6 (4)
0	100	C	71.3 +/- 29.4 (4)
0.1	100	D	18.1 +/- 6.2 (4)

Inkubationstemperatur 25 °C; 2 mM $MgCl_2$;
Anzahl der Versuche in Klammern; Mittelwerte +/- SEM

t-Test für Wertepaare: AB, AC, BD: $p < 0.05$
CD: $p < 0.01$

5.1.2.3. Einfluß von Diamid auf die durch GppNHp induzierte Hemmung der Forskolin-stimulierten AC-Aktivität

Da Diamid offensichtlich die katalytische Aktivität der AC beeinträchtigte (siehe 5.1.2.2.; Mukherjee et al. 1984), war es von Interesse, ob auch eine durch GppNHp induzierte Hemmung der Forskolin-stimulierten AC-Aktivität durch den Zusatz von Diamid beeinflußt werden konnte.

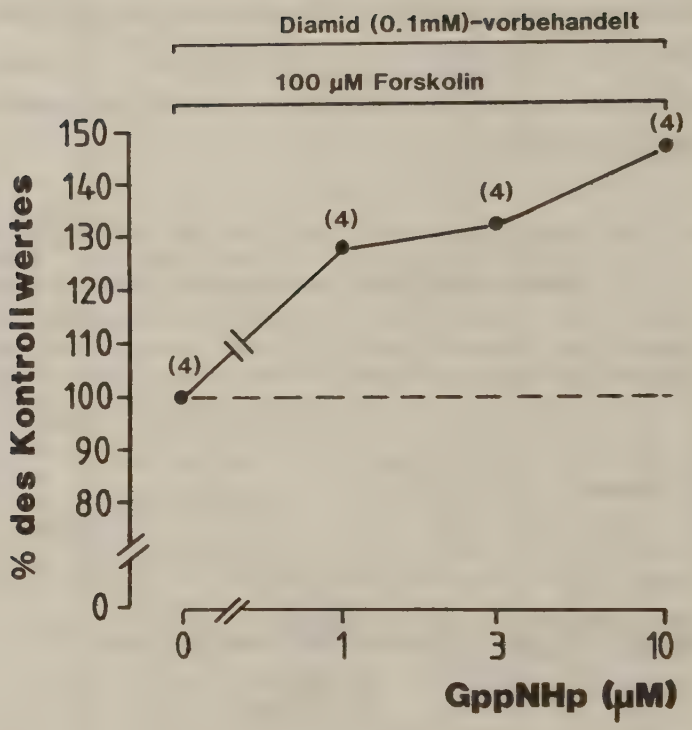

Abb. 5.5.: Einfluß von Diamid (0.1 mM) auf die durch GppNHp induzierte Hemmung der Forskolin-stimulierten AC-Aktivität in groben Membranpräparationen Langerhansscher Inseln der Ratte.

Inkubationstemperatur 25 °C; 2 mM $MgCl_2$;
Anzahl der Versuche in Klammern; mittlere Prozentwerte, bezogen auf den jeweiligen Versuchskontrollwert (=100%);
t-Test für Wertepaare

Im Gegensatz zur Abb. 5.3. konnte bei Anwesenheit von 0.1 mM Diamid (nach 10 minütiger Vorinkubation) keine Hemmung der Forskolin-Stimulation durch den Zusatz von GppNHp gezeigt werden (Abb. 5.5.).

Eher war eine leichte Zunahme der AC-Aktivität von 18.1 (=100%; kein GppNHp) auf 21.2 pmol cAMP/mg min (1 uM GppNHp) zu beobachten (Tab. 5.4.), die aber nicht signifikant war.

Tabelle 5.4.: Einfluß von Diamid (0.1 mM) auf die durch GppNHp induzierte Hemmung der Forskolin-stimulierten AC-Aktivität in groben Membranpräparationen Langerhansscher Inseln der Ratte.

		100 uM Forskolin			
GppNHp (uM)	Diamid (mM)	pmol cAMP/mg Protein min			
0	0	A	71.3 +/- 29.4	(100%)	(4)
1	0	B	50.9 +/- 19.1	(72.3%)	(4)
3	0	C	73.4 +/- 24.4	(110.5%)	(4)
10	0	D	71.6 +/- 22.8	(114.3%)	(4)
0	0.1	E	18.1 +/- 6.2	(100%)	(4)
1	0.1	F	21.2 +/- 7.5	(128%)	(4)
3	0.1	G	23.6 +/- 7.9	(132.3%)	(4)
10	0.1	H	24.2 +/- 6.6	(147%)	(4)

Inkubationstemperatur 25 °C; 2 mM $MgCl_2$; in Klammern sind mittlere Prozentwerte der Versuche angegeben, bezogen auf den jeweiligen Versuchskontrollwert (=100%);
Anzahl der Versuche in Klammern; Mittelwerte +/- SEM

t-Test für Wertepaare: AB: $p < 0.05$
AC, AD, BC, BD, CD: n.s.
EF, EG, EH, FG, FH, GH: n.s.

5.1.2.4. Einfluß von N-Ethylmaleimid auf die durch GppNHp induzierte Hemmung der Forskolin-stimulierten AC-Aktivität

Da bei intakten Inseln der Ratte eine dem Diamid vergleichbare Wirkung auf den cAMP-Spiegel mit dem Thioloxidans NEM erzielt wurde, nämlich eine Potenzierung der Forskolinstimulation (Ammon/Müller/Trier 1985), sollte an Membranpräparationen untersucht werden, ob auch diese Wirkung des NEM möglicherweise durch Ausschaltung des N_i-Proteins zustande kam. Eine Blockade der N_i-vermittelten Hemmung der AC durch NEM wurde bereits 1982 von Jakobs et al. postuliert.

In den 4 Kontrollversuchen mit GppNHp wurde eine Hemmung der Forskolin-stimulierten AC-Aktivität um ca. 23% gegenüber dem Bezugswert ohne GppNHp erhalten (vgl. 5.1.2.1.). Diese Hemmung konnte aber in 4 Versuchen mit 0.1 mM NEM nicht wieder aufgehoben werden (nicht dargestellt).

Im weiteren wurden Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von NEM mit GTP + Somatostatin durchgeführt. Unter 5.2.2.2. sind zudem an Membranen von RIN-A2-Zellen Untersuchungen mit höheren NEM-Konzentrationen beschrieben.

5.1.2.5. Einfluß von N-Ethylmaleimid auf die durch GTP + Somatostatin induzierte Hemmung der Forskolin-stimulierten AC-Aktivität

Wie von Aktories et al. (1983a) an cyc^--Varianten von S49 Lymphoma-Zellen beschrieben wurde, kann eine N_i-vermittelte Hemmung der AC durch GTP unter Zusatz des inhibitorischen Hormones Somatostatin deutlich gemacht werden.

In Abbildung 5.6. ist dargestellt, daß auch in Membranpräparationen Langerhansscher Inseln eine Hemmung der Forskolin-stimulierten AC-Aktivität durch den Zusatz von 1 uM GTP + 1 uM Somatostatin zu beobachten war. Gegenüber dem Kontrollwert ohne GTP betrug die Hemmung ca. 37%, d.h. die Aktivität der Adenylatcyclase ging von 71.6 (ohne GTP) auf 45.3 pmol cAMP/mg min (1 uM GTP) signifikant zurück (Tabelle 5.5.).

Diese Hemmung war nach 10 minütiger Vorbehandlung mit 0.1 mM NEM vollständig aufgehoben (Abb. 5.6.). Vielmehr war eine - allerdings nicht signifikante - Steigerung der AC-Aktivität von 31.6 (Kontrollwert ohne GTP) auf 52.9 pmol cAMP/mg min (1 uM GTP) festzustellen (Tabelle 5.5.).

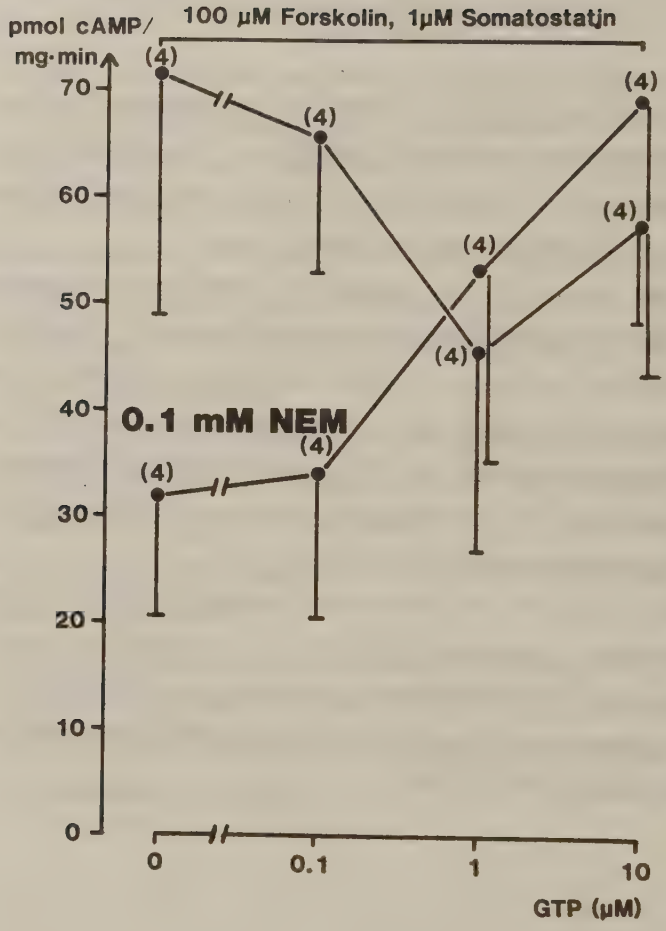

Abb. 5.6.: Einfluß von NEM (0.1 mM) auf die durch GTP + Somatostatin (1 uM) induzierte Hemmung der Forskolin-stimulierten AC-Aktivität in groben Membranpräparationen Langerhansscher Inseln der Ratte.

Inkubationstemperatur 25 °C; 2 mM $MgCl_2$; Mittelwerte +/- SEM, Anzahl der Versuche in Klammern; angegeben in pmol gebildetes cAMP pro mg Protein und min; t-Test für Wertepaare

Tab. 5.5.: Einfluß von NEM (0.1 mM) auf die durch GTP + Somatostatin (1 uM) induzierte Hemmung der Forskolin-stimulierten AC-Aktivität in groben Membranpräparationen Langerhansscher Inseln der Ratte.

			100 uM Forskolin		
GTP (uM)	Somatost.(uM)	NEM (mM)	pmol cAMP/mg Protein min		
0	0	0	A	54.3 +/- 14.7	(4)
0	1	0	B	71.6 +/- 22.6	(4)
0.1	1	0	C	65.5 +/- 12.8	(4)
1	1	0	D	45.3 +/- 18.5	(4)
10	1	0	E	57.3 +/- 9.0	(4)
0	0	0.1	F	30.8 +/- 6.4	(4)
0	1	0.1	G	31.6 +/- 4.4	(4)
0.1	1	0.1	H	33.9 +/- 13.8	(4)
1	1	0.1	I	52.9 +/- 18.2	(4)
10	1	0.1	K	69.1 +/- 25.8	(4)

Inkubationstemperatur 25 °C; 2 mM $MgCl_2$; Anzahl der Versuche in Klammern; Mittelwerte +/- SEM

t-Test für Wertepaare:
AB, FG: n.s.
BC, BE, DE: n.s.
BD: $p < 0.05$
GH, GI, GK, HI, HK, IK: n.s.
AF, BG: n.s.

5.1.3. Einfluß von Propylthiouracil auf die Basalaktivität der AC

Da in intakten Langerhansschen Inseln ein stimulatorischer Effekt von Thiouracilen auf den cAMP-Spiegel festgestellt worden war (Müller 1985, Anazodo 1986, unveröffentlicht), mußte ermittelt werden, ob diese Wirkung durch eine direkte Stimulation des AC-Systems zustande kam. Zu diesem Zweck wurde das bisher potenteste Derivat Propylthiouracil (PTU) in zwei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt.

Wie aus Abb. 5.7. zu entnehmen ist, zeigten weder 2.8 noch 5.6 mM PTU einen Anstieg der AC-Aktivität. Vielmehr nahm die AC-Aktivität gegenüber dem Ausgangswert (ohne PTU) von 18.5 auf 13.0 pmol cAMP//mg min (5.6 mM PTU) leicht ab, war aber statistisch nicht signifikant (Tabelle 5.6.).

Tab. 5.6.: Einfluß von PTU (2.8 und 5.6 mM) auf die Basalaktivtät der AC in groben Membranpräparationen Langerhansscher Inseln der Ratte.

PTU (mM)		pmol cAMP/mg Protein min	
0	A	18.5 +/- 7.2	(3)
2.8	B	15.6 +/- 4.4	(3)
5.6	C	13.0 +/- 4.0	(3)

Anzahl der Versuche in Klammern; Mittelwerte +/- SEM

t-Test für Wertepaare: AB, AC, BC: n.s.

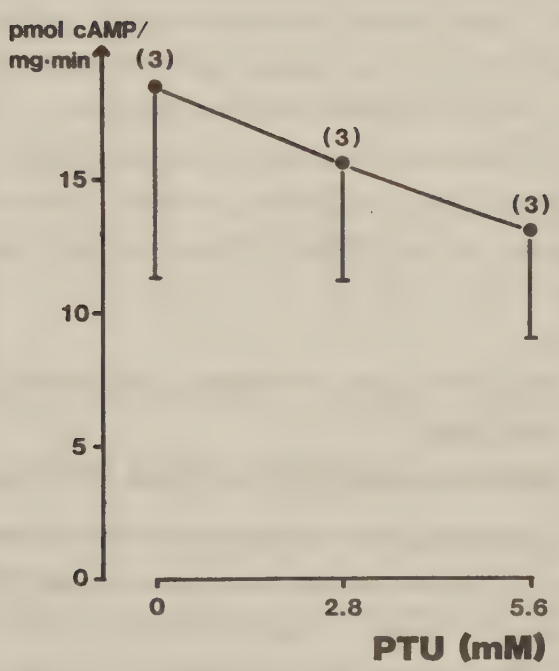

Abb. 5.7.: Einfluß von PTU (2.8 und 5.6 mM) auf die Basalaktivtät der AC in groben Membranpräparationen Langerhansscher Inseln der Ratte.

Anzahl der Versuche in Klammern; Mittelwerte +/- SEM, angegeben in pmol gebildetes cAMP pro mg und min; t-Test für Wertepaare

5.2. AC-Aktivität in RIN-A2-Zellen

Die seit 1985 in unserem Labor etablierte insulinsezernierende Tumorzellinie RIN ("rat insulinoma")-A2 sollte auf die Existenz und Funktion eines Adenylatcyclasesystems untersucht werden. Von Interesse war v.a., ob dieses Enzymsystem voll funktionsfähig war und damit der AC in Langerhansschen Inseln entsprach.
Somit mußten Messungen der Basalaktivität und Untersuchungen zur Stimulierbarkeit und Inhibierbarkeit an diesem System durchgeführt werden. Weiterhin wurde die Wirkung von Thioloxidantien untersucht.

5.2.1. Basale AC-Aktivität und Stimulation durch Forskolin und Natriumfluorid: Vergleich von Langerhansschen Inseln und RIN-A2-Zellen

Zunächst mußte festgestellt werden, ob sich die basalen AC-Aktivitäten in Zellmembranen von RIN-A2-Zellen in der gleichen Größenordnung befinden wie in Langerhansschen Inseln. Wie Tabelle 5.7. zeigt, lagen die Basalwerte bei RIN-A2-Zellen im Bereich von 25.7 - 36.0 pmol cAMP/mg min, während sich die AC-Aktivität bei Langerhansschen Inseln deutlich niedriger zwischen 6.5 und 10.5 pmol cAMP/mg min bewegte.
Ebenso wie bei Langerhansschen Inseln war das AC-System von RIN-A2-Zellen durch den Zusatz von 10 mM NaF und von 100 uM Forskolin sehr deutlich stimulierbar (Abb. 5.8.). Die Zunahme durch 10 mM NaF betrug bei RIN-A2-Zellen 96.0 gegenüber 15.8 pmol cAMP/mg min bei Langerhansschen Inseln; 100 uM Forskolin steigerte die AC-Aktivität von RIN-A2-Zellen um 190.0 gegenüber 60.8 pmol cAMP/mg min bei Langerhansschen Inseln (Tabelle 5.7.).

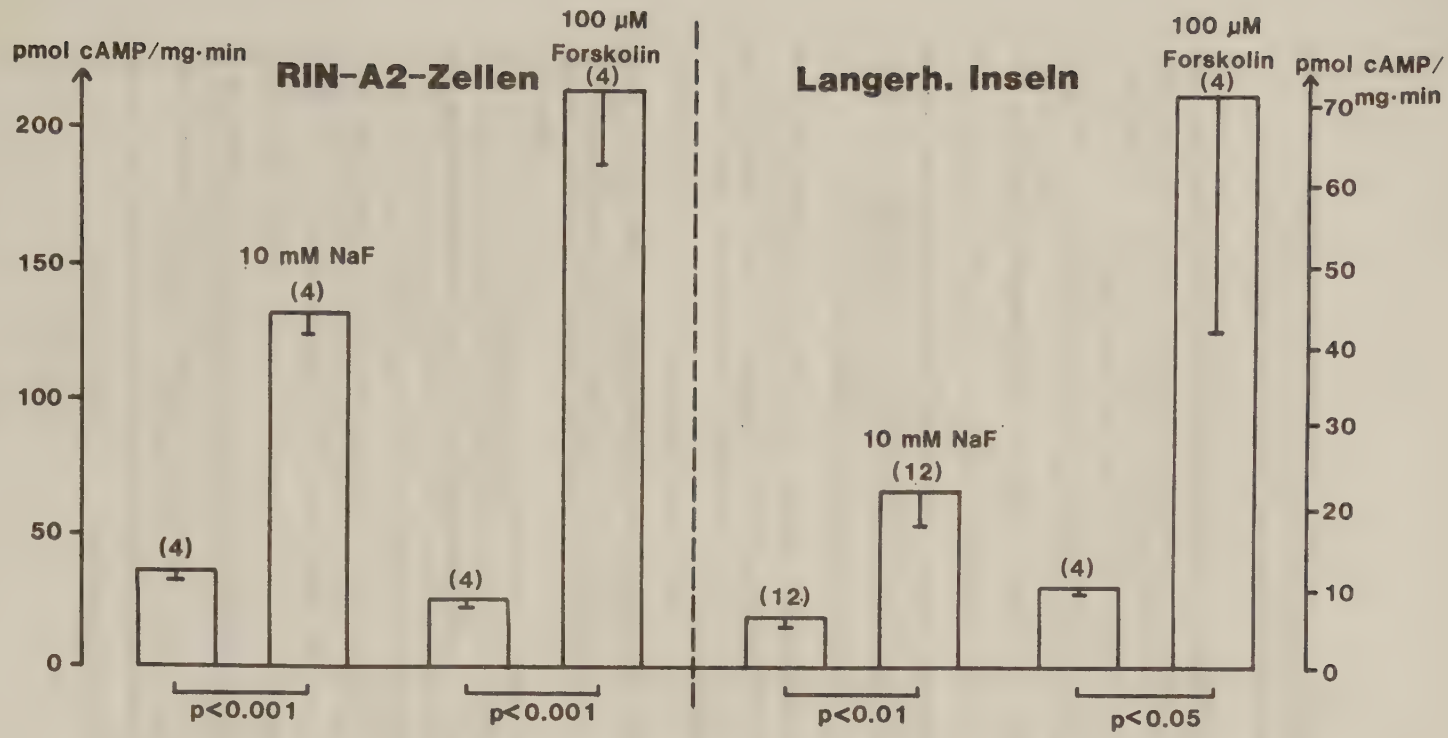

Abb. 5.8.: Einfluß von Natriumfluorid (10 mM) und Forskolin (100 uM) auf die AC-Aktivität in groben Membranpräparationen aus RIN-A2-Zellen. Vergleich der AC-Aktivität Langerhansscher Inseln und von RIN-A2-Zellen.

Anzahl der Proben aus 4-6 Versuchen in Klammern; Mittelwerte +/- SEM, angegeben in pmol gebildetes cAMP pro mg Protein und min; t-Test für Wertepaare

Auch hier lagen also die Absolutwerte der AC-Aktivität in groben Membranpräparationen von RIN-A2-Zellen deutlich höher.

Vergleicht man allerdings das Verhältnis der stimulierten Werte zu ihren Basalwerten zwischen RIN-A2-Zellen und Langerhansschen Inseln, ergeben sich sehr ähnliche Resultate:
Durch 10 mM NaF wurde der Basalwert von RIN-A2-Zellen ca. um den Faktor 3.7 erhöht, während bei Langerhansschen Inseln eine ca. 3.4 fache Stimulation resultierte. Wenn 100 uM Forskolin dem Testmedium zugesetzt wurde, ergab sich bei RIN-A2-Zellen eine ca. 8.4 fache Erhöhung der Basalwerte, dagegen lag bei Langerhansschen Inseln dieser Faktor bei ca. 6.8.
Unterschiedliche Masstäbe in der Abb. 5.8. verdeutlichen die starke Ähnlichkeit der AC-Systeme in ihrer Reaktion auf Stimulatoren.

Tab. 5.7.: Einfluß von Natriumfluorid (10 mM) und Forskolin (100 uM) auf die AC-Aktivität in groben Membranpräparationen aus RIN-A2-Zellen. Vergleich der AC-Aktivität Langerhansscher Inseln und von RIN-A2-Zellen.

pmol cAMP/mg Protein min		
	RIN-A2-Zellen	Langerhanssche Inseln
Kontrolle	A 36.0 +/- 3.8 (4)	B 6.5 +/- 1.3 (12)
10 mM NaF	C 132.0 +/- 8.4 (4)	D 22.3 +/- 4.3 (12)
Kontrolle	E 25.7 +/- 3.3 (4)	F 10.5 +/- 0.6 (4)
100 uM Forsk.	G 215.7 +/- 26.5 (6)	H 71.3 +/- 29.4 (4)

Anzahl der Proben aus 4-6 Versuchen in Klammern;
Mittelwerte +/- SEM.

t-Test für Wertepaare: AC, EG: $p < 0.001$
BD: $p < 0.01$
FH: $p < 0.05$

5.2.2. Hemmung der AC-Aktivität; Einfluß von Thioloxidantien

Nachdem die Stimulierbarkeit des AC-Systems von RIN-A2-Zellen gezeigt worden war, mußte untersucht werden, ob sich dieses Enzymsystem auch durch stabile GTP-Analoga hemmen ließ und inwieweit Thioloxidantien einen Einfluß auf die AC-Aktivität zeigen konnten.

5.2.2.1. Einfluß von N-Ethylmaleimid auf die Forskolin-stimulierte AC-Aktivität

Da die Erniedrigung sowohl der basalen als auch der stimulierten AC-Aktivität Langerhansscher Inseln durch Thioloxidantien von Mukherjee et al. (1984) beschrieben wurde (siehe 1.1.3.3.), war auch die Wirkung steigender Konzentrationen von NEM auf die Forskolin-stimulierte AC-Aktivität in RIN-A2-Zellen von Interesse.

Wie in Abb. 5.9. zu erkennen ist, führte NEM bereits im Konzentrationsbereich ab 0.1 mM zu einer signifikanten Abnahme der durch 100 uM Forskolin stimulierten Enzymaktivität. Gegenüber dem Kontrollwert von 215.7 pmol cAMP/mg min (ohne NEM) nahm die Aktivität dosisabhängig bis auf 85.6 pmol cAMP/mg min ab (0.5 mM NEM in Tab. 5.8.).

Dieser Wert lag allerdings noch immer deutlich über dem Basalwert ohne Forskolin (25.7 pmol cAMP/mg min in Tab. 5.7.), d.h. die Forskolinstimulation wurde keineswegs vollständig blockiert.

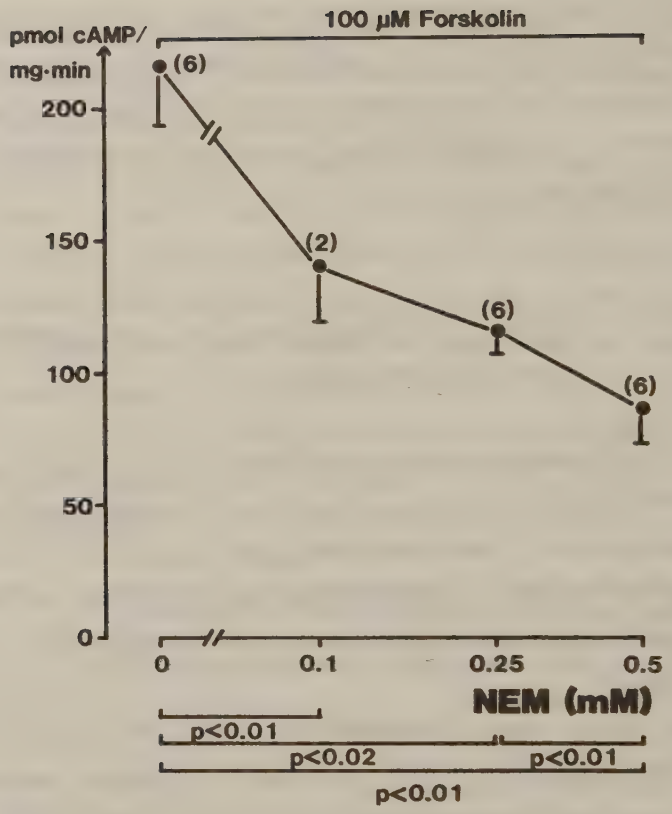

Abb. 5.9.: Einfluß von NEM (0.1, 0.25, 0.5 mM) auf die Forskolin-stimulierte AC-Aktivität in groben Membranpräparationen aus RIN-A2-Zellen.

Inkubationstemperatur 25 °C; 2 mM $MgCl_2$;
Anzahl der Versuche in Klammern; Mittelwerte +/- SEM, angegeben in pmol gebildetes cAMP pro mg Protein und min; t-Test

Tab. 5.8.: Einfluß von NEM (0.1, 0.25, 0.5 mM) auf die Forskolin-stimulierte AC-Aktivität in groben Membranpräparationen von RIN-A2-Zellen.

NEM (mM)	100 uM Forskolin	pmol cAMP/mg Protein min
0	A	215.7 +/- 26.5 (6)
0.1	B	139.5 +/- 19.9 (2)
0.25	C	115.0 +/- 10.2 (6)
0.5	D	85.6 +/- 11.9 (6)

Inkubationstemperatur 25 °C; 2 mM $MgCl_2$;
Anzahl der Versuche in Klammern; Mittelwerte +/- SEM

t-Test: AB, AD: $p < 0.01$
AC: $p < 0.02$

5.2.2.2. Einfluß von N-Ethylmaleimid auf die durch GppNHp induzierte Hemmung der Forskolin-stimulierten AC-Aktivität

Um wie bei Langerhansschen Inseln (siehe 5.1.2.1.) einen indirekten Beweis für die Existenz eines inhibitorischen N-Proteins (Seamon/Wetzel 1984) zu erhalten, wurde auch an Membranpräparationen von RIN-A2-Zellen versucht, eine Hemmung der Forskolin-stimulierten AC-Aktivität durch niedrige GppNHp-Konzentrationen zu demonstrieren.
Wie Abb. 5.10. (obere Kurve) zeigt, war bei 1 uM GppNHp eine signifikante Hemmung zu beobachten, während bei 10 uM GppNHp die Kurve schon wieder ansteigende Tendenz verriet.

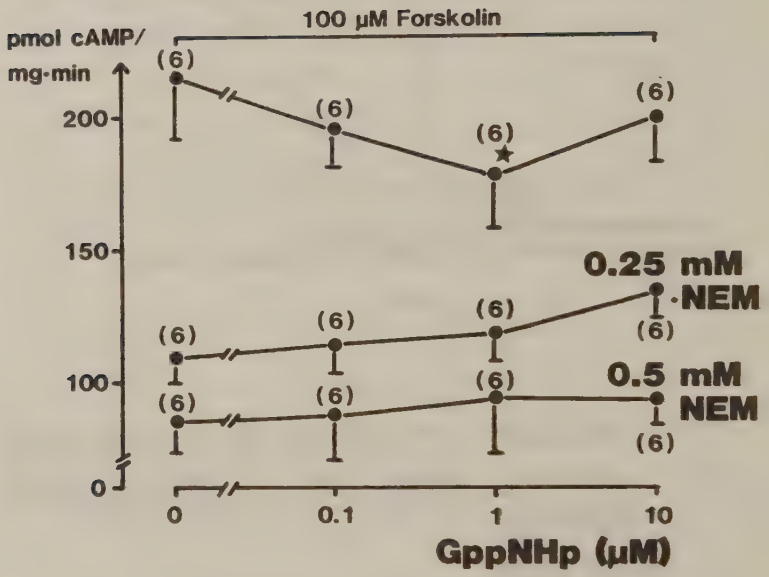

Abb. 5.10.: Einfluß von NEM (0.25 und 0.5 mM) auf die durch GppNHp induzierte Hemmung der Forskolin-stimulierten AC-Aktivität in groben Membranpräparationen aus RIN-A2-Zellen.

Inkubationstemperatur 25 °C; 2 mM $MgCl_2$;
Anzahl der Versuche in Klammern; Mittelwerte +/- SEM, angegeben in pmol gebildetes cAMP pro mg Protein und min; t-Test für Wertepaare

Tab. 5.9.: Einfluß von NEM (0.25 und 0.5 mM) auf die durch GppNHp induzierte Hemmung der Forskolin-stimulierten AC-Aktivität in groben Membran-präparationen aus RIN-A2-Zellen.

		100 uM Forskolin	
GppNHp (uM)	NEM (mM)	pmol cAMP/mg Protein min	
0	0	A	215.7 +/- 26.5 (6)
0.1	0	B	197.6 +/- 16.7 (6)
1	0	C	187.4 +/- 25.7 (6)
10	0	D	202.6 +/- 20.5 (6)
0	0.25	E	115.0 +/- 10.2 (6)
0.1	0.25	F	119.8 +/- 11.7 (6)
1	0.25	G	124.3 +/- 12.9 (6)
10	0.25	H	134.2 +/- 12.5 (6)
0	0.5	I	85.6 +/- 11.9 (6)
0.1	0.5	K	87.3 +/- 15.9 (6)
1	0.5	L	94.1 +/- 21.2 (6)
10	0.5	M	93.6 +/- 9.6 (6)

Inkubationstemperatur 25 °C; 2 mM $MgCl_2$;
Anzahl der Versuche in Klammern; Mittelwerte +/-SEM

t-Test für Wertepaare: AB, AD: n.s.
AC: $p < 0.05$
EF, EG, EH: n.s.
IK, IL, IM: n.s.

Gegenüber dem Kontrollwert (ohne GppNHp) von 215.7 pmol cAMP/mg min nahm die AC-Aktivität auf 187.4 pmol cAMP/mg min ab (1 uM GppNHp in Tabelle 5.9.).

Da 0.1 mM NEM in groben Membranpräparationen Langerhansscher Inseln eine GppNHp-induzierte Hemmung der Forskolin-stimulierten

AC- [illegible]ht blockierte, wurden an Membranpräparationen von RIN-A2-Zellen Untersuchungen mit höheren Konzentrationen von NEM unternommen.

Abb. 5.10. zeigt, daß in Anwesenheit von 0.25 und 0.5 mM NEM (untere Kurven) keinerlei Hemmung der Forskolin-stimulierten AC-Aktivität durch GppNHp mehr festzustellen war. Auch eine signifikante Stimulation durch NEM trat nicht auf (Tab 5.9.).

5.2.2.3. Einfluß von Diamid auf die basale und Natriumfluorid-stimulierte AC-Aktivität

Um weitere Aufschlüsse über die Wirkung von Thioloxidantien auf das AC-System zu erhalten, wurden Experimente mit dem Thiol-oxidans Diamid an Membranpräparationen von RIN-A2-Zellen durchgeführt, da Diamid ja in der Lage war, die GppNHp-induzierte Hemmung der Forskolin-stimulierten AC Langerhansscher Inseln aufzuheben (siehe 5.1.2.2.).

Ebenso wie bei Langerhansschen Inseln führte Diamid zu einer signifikanten Abnahme der basalen AC-Aktivität von RIN-A2-Zellen, gleichgültig ob GTP (10 uM) im Testmedium anwesend war oder nicht (Abb. 5.11.). Aber auch die NaF(10 mM)-stimulierte AC-Aktivität von RIN-A2-Zellen wurde von 132.1 (ohne Diamid) auf 105.9 pmol cAMP/mg min (mit 0.1 mM Diamid) gesenkt (Tabelle 5.10.).

Besondere Beachtung verdient die Tatsache, daß die absolute Zunahme der AC-Aktivität durch den Zusatz von 10 mM NaF in Anwesenheit von 0.1 mM Diamid fast genauso hoch lag (86.5 pmol cAMP/mg min; F-D in Tabelle 5.10.) wie in Abwesenheit des Thioloxidans (96.1 pmol cAMP/mg min; E-C in Tabelle 5.10.).

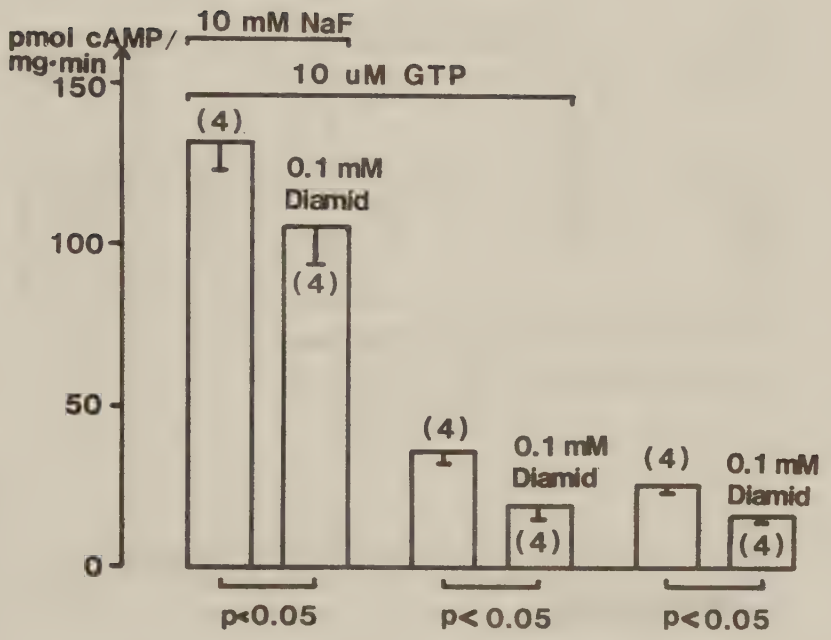

Abb. 5.11.: Einfluß von Diamid (0.1 mM) auf die basale und NaF (10 mM)-stimulierte AC-Aktivität in groben Membranpräparationen aus RIN-A2-Zellen.

Anzahl der Versuche in Klammern; Mittelwerte +/- SEM, angegeben in pmol gebildetes cAMP pro mg Protein und min; t-Test für Wertepaare

Tab. 5.10.: Einfluß von Diamid (0.1 mM) auf die basale und NaF (10 mM)-stimulierte AC-Aktivität in groben Membranpräparationen aus RIN-A2-Zellen.

Diamid (mM)	NaF (mM)	GTP (uM)	pmol cAMP/mg Protein min		
0	0	0	A	25.7 +/- 3.3	(4)
0.1	0	0	B	16.2 +/- 2.2	(4)
0	0	10	C	36.0 +/- 3.8	(4)
0.1	0	10	D	19.4 +/- 3.8	(4)
0	10	10	E	132.1 +/- 9.6	(4)
0.1	10	10	F	105.9 +/- 18	(4)

Anzahl der Versuche in Klammern; Mittelwerte +/- SEM

t-Test für Wertepaare: AB, CD, EF: $p < 0.05$
BD: n.s.
DF: $p < 0.01$

5.2.3. Einfluß von Dithiotreitol auf die Forskolin-stimulierte AC-Aktivität

Da eine Oxidation von Thiolgruppen sowohl die basale (5.1.2.2. und 5.2.2.3.) als auch die stimulierte (Forskolin: 5.1.2.2. und 5.2.2.1.; Natriumflourid: 5.2.2.3.) AC-Aktivität von Langerhansschen Inseln bzw. von RIN-A2-Zellen verringerte, war eine besondere Bedeutung von Thiolen bei der Regulation der Adenylatcyclase anzunehmen.

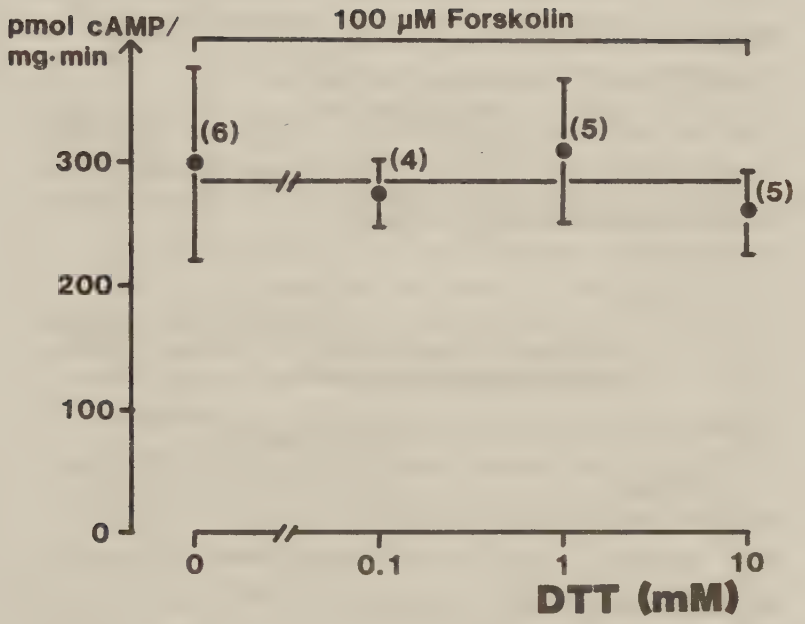

Abb. 5.12.: Einfluß von DTT (0.1, 1 und 10 mM) auf die Forskolin-stimulierte AC-Aktivität in groben Membranpräparationen aus RIN-A2-Zellen.

Anzahl der Versuche in Klammern; Mittelwerte +/- SEM, angegeben in pmol gebildetes cAMP pro mg Protein und min; t-Test

Nun drängte sich eine Frage auf: Konnte durch Zusatz eines Thiolreduktans wie dem Dithiotreitol (DTT) eine Stimulation eventuell verstärkt werden? Laut Voruntersuchungen blieb die Basalaktivität ja weitgehend unbeeinflußt (4.2.5.). Die Beantwortung dieser Frage war auch unter dem Aspekt von Interesse, daß bei den Versuchen mit GppNHp/Forskolin und Thioloxidantien DTT nicht als Oxidationsschutz im Testmedium enthalten war.

Wie der Abb. 5.12. zu entnehmen ist, konnte bei verschiedenen Konzentrationen von DTT keine signifikante Veränderung der Forskolinstimulation beobachtet werden.

Tab. 5.11.: Einfluß von DTT (0.1, 1 und 10 mM) auf die Forskolinstimulierte AC-Aktivität in groben Membranpräparationen aus RIN-A2-Zellen.

DTT (mM)	100 uM Forskolin	pmol cAMP/mg Protein min	
0	A	299.0 +/- 58.1	(6)
0.1	B	274.7 +/- 27.5	(4)
1	C	310.9 +/- 59.8	(5)
10	D	261.9 +/- 33.0	(5)

Anzahl der Versuche in Klammern; Mittelwerte +/- SEM

t-Test: AB, AC, AD, BC, BD, CD: n.s.

6. DISKUSSION

6.1. cAMP-Gehalt und Adenylatcyclase-Aktivität Langerhansscher Inseln

Als die Bedeutung des cAMP als "second messenger", d.h. als Vermittler von Hormonsignalen in die Zelle, erkannt war (Sutherland 1957), wurden zunächst Methoden entwickelt, die eine Bestimmung des intrazellulären cAMP-Gehaltes erlaubten. Die Erkenntnis, daß das cAMP-synthetisierende Enzym, die Adenylatcyclase, ausschließlich in der Zellmembran lokalisiert war, ermöglichte die Erstellung von Tests zur Untersuchung des weitgehend isolierten Enzyms.

Eine Messung des cytosolischen cAMP-Spiegels kann nun in erster Linie Aufschluß über physiologisch ablaufende Prozesse geben, da der cAMP-Gehalt der Zelle nicht ausschließlich durch die Aktivität der Adenylatcyclase bestimmt wird. Vielmehr stellt die cytosolische cAMP-Konzentration auch in der Inselzelle die Resultante dar aus der Neubildung durch die Adenylatcyclase, dem Abbau durch intrazelluläre Phosphodiesterasen und der Abgabe des zyklischen Nukleotids in den Extrazellulärraum (Malaisse 1984). Darüberhinaus unterliegt die Biosynthese dieses second messengers in den Zellen des endokrinen Pankreas vielerlei Regulationsmechanismen sowohl durch den intrazellulären Stoffwechsel als auch durch Nachbarzellen. Man denke nur an die beiden Inselhormone Glucagon und Somatostatin: Während das von pankreatischen A-Zellen sezernierte Glucagon die Adenylatcyclase nach Interaktion mit einem spezifischen Hormonrezeptor stimulieren kann, hat das u.a. aus pankreatischen D-Zellen

stammende Somatostatin einen entsprechenden inhibitorischen Effekt auf dieses Enzym Langerhansscher Inseln.

Die Bestimmung der AC-Aktivität Langerhansscher Inseln kann - im Gegensatz zu Messungen des cAMP-Gehaltes - Aussagen darüber erbringen, ob bestimmte Substanzen, die einen Einfluß auf den cAMP-Spiegel ausüben, direkt an der Adenylatcyclase angreifen und welcher Art diese Interaktion ist. Um definitive Informationen über den Wirkungsmechanismus derartiger Substanzen zu gewinnen, ist also die Bestimmung der AC-Aktivität unerläßlich.

Die AC-Aktivitätsmessung ist aber ein reines in-vitro Testsystem, d.h. getrennt von cAMP-Gehaltsmessungen ist dieses Messverfahren nur bedingt geeignet, exakte Aufschlüsse über physiologische Abläufe in Inselzellen zu geben.

6.2. Methodik der AC-Aktivitätsmessung

6.2.1. In Langerhansschen Inseln

Von anderen Arbeitsgruppen lagen zu Beginn dieser Arbeit einige Publikationen vor, die eine Bestimmung der AC-Aktivität Langerhansscher Inseln beschrieben (z.B. Kuo 1973, Capito 1977). Ausgehend von diesen Verfahrensweisen wurde versucht, insbesondere die Technik der Membranpräparation und die Auswahl der Testsubstanzen zu optimieren.

Die Problematik der Bestimmung der AC-Aktivität Langerhansscher Inseln liegt in erster Linie in der limitierten Menge an Ratteninseln, die pro Versuchstag isoliert werden können. Diesem Sachverhalt wird dieses Verfahren insofern gerecht, daß einerseits, ausgehend von ca. 500-700 Inseln, eine Membranpräparation durchgeführt wird, die eine gewisse Trennung

der Zellmembranpartikel von anderen Zellbestandteilen erlaubt, daß andererseits aber im AC-Test ausreichende Mengen an cAMP gebildet werden, die radioimmunologisch noch detektierbar sind.

Membranpräparation:

Die erste Vorraussetzung für die isolierte Betrachtung der AC-Aktivität Langerhansscher Inseln ist die Zerstörung des Zellverbandes und auch der Einzelzelle.
Für den Homogenisationsvorgang erschien am ehesten die Verwendung eines Ultraturrax geeignet, da bei anderen Techniken entweder ein Materialverlust durch Adsorption (z.B. Glas-/Glas-Homogenisatoren) bzw. eine selektive Auswahl von Membranpartikeln oder die Entstehung von Vesikeln aus Membranfetzen (Ultraschall) zu befürchten war.

In zahlreichen Untersuchungen dieser Enzymaktivität wurde direkt ein Homogenat aus isolierten Langerhansschen Inseln eingesetzt (Kuo 1973, Capito 1977, Sharp 1980). Ein Gesamthomogenat weist zwar mit Sicherheit die gesamte AC-Aktivität auf, es sind aber evtl. noch intakte Zellen bzw. Zellorganellen sowie sicherlich auch störende Enzyme (z.B. Phosphodiesterasen) aus dem Cytosol vorhanden.
Wie unter 4.1.2.1. genauer ausgeführt, wurde deshalb eine grobe Membranpräparation durchgeführt, d.h. nicht zerstörte Inselzellbestandteile wurden in einem ersten Zentrifugationsschritt mit geringer Beschleunigung abgetrennt und die Membranpartikel aus dem Überstand in einer zweiten Zentrifugation mit hoher g-Zahl pelletiert und damit von löslichen Faktoren abgetrennt. Eine weitere Anreicherung von Plasmamembranen war wegen der geringen

Mengen an Ausgangsmaterial nicht möglich.

Besonderer Augenmerk wurde im Weiteren auf die Gefahr einer Vesikelbildung gelegt, da sowohl bei "right-side-out" als auch bei "inside-out" Vesikeln eine Verfälschung der Resultate erwartet werden konnte. Durch schrittweise Verringerung der Sucrosekonzentration und damit der Osmolarität sollte insbesondere beim Pufferwechsel diesem Problem entgegengewirkt werden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Essig (1983) in unserem Arbeitskreis konnten die Existenz überwiegend flächiger Membranfetzen nachweisen.

AC-Test:

Die Zerstörung der Inselzellen durch den Homogenisationsvorgang und die anschließende Membranpräparation stellen natürlich eine recht unsanfte Trennung der Adenylatcyclase von ihrem Umgebungsmilieu dar. Essentielle Komponenten, die bei dieser Fraktionierung abgetrennt werden, müssen anschließend - in möglichst physiologischen Konzentrationen - wieder dem Testmedium zugesetzt werden.

Da keine einheitlichen Literaturangaben über die zu substituierenden Stoffe und deren Konzentrationen mit entsprechend rationaler Begründung existierten, mußten diesbezüglich eigene Untersuchungen angestellt werden.

Für die Funktion der Adenylatcyclase ist in erster Linie ATP als Ausgangssubstrat und Enregieträger erforderlich. Wie unter 4.2.2. ausgeführt, war eine Konzentration von 1 mM ausreichend. Auf den Zusatz eines ATP-regenerierenden Systems konnte verzichtet werden, da im Gegensatz zu Leberzellen in dieser groben Membran-

präparation Langerhansscher Inseln keine nennenswerte Nukleotid-pyrophosphatase-Aktivität festgestellt wurde. Darüberhinaus verringert EDTA (0.1 mM) im Testmedium durch die Bindung von zweiwertigen Metallionen die Aktivität dieses unerwünschten Enzyms.

Neben ATP sind v.a. Mg^{2+}-Ionen von elementarer Bedeutung für das Adenylatcyclase-System, insbesondere für die katalytische Einheit (Cech 1980). Stimulation über N_s und Inhibition über N_i sollen letztendlich nur in einer veränderten Affinität der katalytischen Einheit für Mg^{2+} resultieren, das damit die Steuerfunktion der Enzymaktivität übernimmt (Jakobs 1983, Bockaert 1984). Das eigentliche Substrat für die Adenylatcyclase stellt wohl Mg-ATP dar (Ross 1980).
Somit mußte auch dieses Metallion in ausreichendem Maße zur Verfügung stehen. Während zunächst für die basale und die stimulierte AC-Aktivität 5 mM $MgCl_2$ eingesetzt wurde, läßt sich eine N_i-vermittelte Hemmung laut Jakobs (1984 und persönliche Mitteilung) besser bei niedriger Mg^{2+}-Ionenkonzentration beobachten. Demzufolge wurde in den entsprechenden Versuchen die Mg^{2+}-Konzentration auf 2 mM erniedrigt.

Wie von Cassel et al. (1977) beschrieben, ist GTP für die N-Proteine der Adenylatcyclase essentiell, da es den Aktivierungszustand dieser Regulatorproteine in erster Linie steuert (Abb. 1.10.). In allen Versuchen, in denen nicht eine von GTP bzw. seinem stabilen Analogon GppNHp induzierte Wirkung auf die Adenylatcyclase untersucht werden sollte, wurde deshalb GTP (30 uM) zugesetzt (4.2.4.).

Um eine Hemmung der sicherlich noch funktionsfähigen membran-

gebundenen Phosphodiesterase zu erreichen und damit einen sofortigen Wiederabbau von gerade gebildetem cAMP zu verhindern, wurde Theophyllin-Ethylendiamin (1 mM) eingesetzt. Dieses Aminophyllin hat gegenüber dem potenteren PDE-Hemmstoff Isobutylmethylxanthin (IBMX) den Vorteil, daß der Radioimmunoassay für cAMP kaum beeinflußt wird (4.2.1.).

Die in unverletzten Langerhansschen Inseln nachgewiesenen thiolregenerierenden Systeme, seien es nun NADPH/NADP oder GSH/GSSG (Ammon 1980a), gehen natürlich bei einer Fraktionierung verloren. Als protektives Element gegenüber Luftsauerstoff und anderen oxidativen Einflüssen wurde deshalb das Thiolreduktans Dithiotreitol eingesetzt (4.2.5.).
Bei Untersuchungen mit Thioloxidantien mußte aber logischerweise auf diese Substanz verzichtet werden, denn z.B. vermag Diamid in einer Redoxreaktion mit DTT zu reagieren (Ammon/Schulze 1985, unveröffentlicht).

cAMP-Bestimmung:

Die im Verlauf des AC-Tests gebildeten Mengen cAMP konnten nur mit einer außerordentlich empfindlichen Messmethode erfaßt werden.
Da die von Salomon et al. (1974) beschriebene Methode mit (^{32}P)ATP als Ausgangssubstrat keine genügende Sensitivität aufwies (4.2.8.), blieb nur das Bestimmungsverfahren durch einen cAMP-Radioimmunoassay als Alternative. Dessen Empfindlichkeit wurde durch einen Acetylierungsvorgang nach Harper (1975) bzw. Frandsen (1976) bis in den fmol-Bereich gesteigert (3.4.4.).
Um Störeffekte von ATP (4.2.2.) bei dieser Bestimmungsmethode zu

verringern, wurde versucht, nichtzyklische Nukleotide vorher durch eine Zinkcarbonat-Fällung abzutrennen, wie von Thams et al. (1984) beschrieben.

Die Überprüfung der Zeitlinearität (4.2.6.) und der Nachweis der Stimulierbarkeit durch NaF (4.2.7.) konnten zeigen, daß die hier beschriebene Technik der Membranpräparation und des Adenylatcyclase-Tests für eine Bestimmung der AC-Aktivität geeignet war.

6.2.2. AC-Aktivität in RIN-A2-Zellen

Die Methode der Bestimmung der AC-Aktivität Langerhansscher Inseln wurde für RIN-A2-Zellen praktisch vollständig übernommen. Lediglich die Gewinnung des Ausgangsmaterials wurde modifiziert, war aber erheblich erleichtert.
Besonderes Augenmerk wurde allerdings darauf gelegt, daß das Ablösen der Tumorzellen vom Gefäßboden ohne Trypsin erfolgte, da dieses Enzym bereits in sehr geringer Dosis eine Inaktivierung des N_i-Proteins bewirken kann (Jakobs 1984). Dies würde bedeuten, daß z.B. eine GppNHp/Forskolin-induzierte Hemmung nach Trypsinvorbehandlung nicht zu beobachten ist.
Die unter 5.2. beschriebenen Versuchsergebnisse belegen, daß diese Verfahrensweise auch die Messung der AC-Aktivität in RIN-A2-Zellen ermöglicht.

6.3. Bedeutung von Thiolen bei der Regulation der AC-Aktivität Langerhansscher Inseln

Neben einer Beteiligung von Thiolgruppen bei der Insulinsekretion (Ammon und Mark 1985) scheint deren Redoxstatus auch von Bedeutung für die Regulation des Adenylatcyclase-Systems zu sein. Diese Steuerung läuft wie unter 1.1.3.1. beschrieben, zweiseitig ab, d.h. über getrennte Rezeptorkategorien und zwei funktionell unterschiedliche Regulatorproteine kann das Enzym sowohl stimuliert als auch inhibiert werden (Abb. 1.8.).

Nun stellte sich die Frage, an welchen Komponenten der Adenylatcyclase reaktive SH-Gruppen lokalisiert sind und ob unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber Thiolreagentien bestehen.

Untersuchungen der cAMP-Spiegel und der AC-Aktivität in Adipocyten und auch in Langerhansschen Inseln (Mukherjee 1977, 1979, 1984) gaben Anhaltspunkte für die Existenz von Thiolgruppen an der katalytischen Einheit, die möglichst im reduzierten Zustand vorliegen sollten. Aber auch zusätzliche Redoxstellen an einer erstrangigen Regulatorkomponente wurden vermutet (Mukherjee 1984) (siehe 1.1.3.3.).

Ein Problem dieser Untersuchungen war allerdings, daß die Thiol-oxidantien in recht hohen Konzentrationen eingesetzt wurden, wie z.B. 0.5 mM Diamid. Ammon et al. (1982) konnten aber zeigen, daß bereits Diamid-Konzentrationen von 0.25 mM in der intakten Insel zu einer deutlichen Abnahme (ca. 30%) der cytosolischen ATP-Spiegel führte. Dies wurde sogar bei einer stimulatorischen Glucose-Konzentration von 16.7 mM festgestellt, so daß dies nicht der limitierende Faktor sein konnte.

In der Folgezeit wurden deshalb Versuche mit Diamid nur mit Konzentrationen bis zu 0.1 mM durchgeführt. Auch diese verhältnismäßig niedrige Diamid-Konzentration vermochte den cAMP-Gehalt Langerhansscher Inseln , der durch 16.7 mM Glucose erhöht war, etwas zu erniedrigen (Ammon 1982). Basale cAMP-Spiegel (bei 5.6 mM Glucose) blieben unbeeinflußt (Ammon/Müller/Trier 1985).

In Membranfraktionen Langerhansscher Inseln bewirkte 0.1 mM Diamid dagegen bereits eine deutliche Abnahme der unstimulierten AC-Aktivität. Es muß bei diesen in-vitro Versuchen aber in Betracht gezogen werden, daß im Gegensatz zu intakten Pankreasinseln, die einen physiologischen thiolregenerierenden Pool im Cytosol besitzen, der wohl nur teilweise von 0.1 mM Diamid blockiert wird (Ammon 1982), ein derartiges System in einer groben Membranpräparation nicht existiert. Deshalb wird dem Testmedium üblicherweise das Thiolreduktans DTT zugesetzt, um kritische Thiolgruppen der Adenylatcyclase vor Oxidation zu schützen (4.2.5.).
Um aber die Wirkung von Thioloxidantien auf die AC-Aktivität zu untersuchen, war der Einsatz eines thiolprotektiven Systems (DTT) in millimolarem Überschuß nicht ratsam. Es mußte deshalb erwartet werden, daß beim AC-Test in Abwesenheit reduzierter Thioläquivalente Thioloxidantien an SH-Gruppen der Adenylatcyclase zumindest in quantitativ veränderter Form gegenüber der intakten Zelle angreifen.

Um weitere Erkenntnisse über die Lokalisation und Bedeutung von SH-Gruppen an Komponenten der Adenylatcyclase zu gewinnen, genügte es aber nicht, nur die Wirkung von Thioloxidantien auf

die basale AC-Aktivität zu untersuchen.

Nun steht seit wenigen Jahren ein Stoff im Mittelpunkt des Interesses aller "cAMP-Forscher": das Forskolin.

Forskolin stimulierte in nahezu allen bisher untersuchten Geweben die AC-Aktivität stark (Daly 1984). Eine Ausnahme in dieser Hinsicht bildeten bislang nur die Adenylatcyclase von Spermazellen und Testes (Stengel 1982), die entweder mit keiner oder nur einer schwachen Zunahme ihrer Aktivität auf einen Forskolinzusatz reagierten.

Da die stimulatorische Wirkung des Forskolins im Vergleich zu den bisher bekannten Stimulatoren der Adenylatcyclase wesentlich stärker ausgeprägt war und zudem rezeptorunabhängig verlief (Seamon und Daly 1981), entwickelte sich Forskolin sehr schnell zum "tool" der Wahl, wenn cAMP-bedingte Vorgänge untersucht und die Funktion der Adenylatcyclase im Zusammenspiel ihrer Untereinheiten erforscht werden sollten. Nicht zuletzt ermöglichte dieses Diterpen die heute gültige Vorstellung vom Aufbau des Adenylatcyclase-Systems (1.1.3.1.).

Neuartig war der Wirkungsmechanismus, mit dem Forskolin die Adenylatcyclase aktivierte.

Seamon und Daly (1981) zeigten an cyc^--Varianten von S49 Lymphoma-Zellen, die kein N_s-Protein besitzen, trotzdem einen starken stimulatorischen Effekt von Forskolin auf die Adenylatcyclase. Dies wurde neben Befunden von Ross (1982), die dies in Enzympräparationen ohne N_s-Aktivität bestätigten, als Beweis für die direkte Wirkung von Forskolin auf die katalytische Einheit angesehen. Weiter untermauert wurde dies durch Bindungsstudien von solubilisierten katalytischen Einheiten der Adenylatcyclase an Forskolin-beladenen Chromatographiesäulen (Pfeuffer 1982).

Das N_s-Protein selbst scheint aber ebenfalls einen Angriffspunkt für Forskolin darzustellen, da die Wirkung stimulatorischer Hormone auf die Adenylatcyclase bereits durch substimulatorische Konzentrationen von Forskolin verstärkt bzw. sogar potenziert werden konnte (Seamon 1981a, Darfler 1982). Auch wurde die maximale Anzahl von "High-Affinity"-Bindungsstellen für Forskolin durch GppNHp oder NaF in Rattenhirnmembranen verstärkt, was eine Beteiligung von N-Proteinen bei der Forskolinstimulation nahelegt (Nelson/Seamon 1985).

Auch uns erschien Forskolin als das geeignetste Werkzeug, um Aufschlüsse über die Bedeutung von Thiolgruppen bei der Regulation der Adenylatcyclase zu erhalten.

Nachdem Wiedenkeller/Sharp (1983) sowie Ammon/Müller (1985) eine dosisabhängige Zunahme des cAMP-Gehaltes in der Langerhansschen Insel durch Forskolin festgestellt hatten, war es natürlich von Interesse herauszufinden, ob dieser Effekt durch eine direkte Stimulation der Adenylatcyclase zustande gekommen war.

Auch in groben Membranpräparationen Langerhansscher Inseln führte Forskolin konzentrationsabhängig zu einer starken Zunahme der AC-Aktivität (5.1.1.1.), was von Malaisse et al. (1984a) bestätigt wurde.

Die durch Forskolin stimulierte AC-Aktivität in Membranfraktionen Langerhansscher Inseln wurde ebenso wie die Basalaktivität von einer Thioloxidation mittels Diamid stark beeinträchtigt (5.1.2.2.), wobei die Diamid-bedingte Abnahme im Falle von Forskolin absolut gesehen wesentlich grösser war. Allerdings war auch in Anwesenheit von Diamid noch immer eine deutliche Stimulation durch Forskolin festzustellen.

Dies bedeutet, daß die Adenylatcyclase, die vornehmlich an ihrer katalytischen Einheit von Forskolin stimuliert wurde, zumindest genauso empfindlich gegenüber Thioloxidantien ist wie im Basalzustand. Es findet also durch Forskolin kein Einschluß kritischer Thiole der katalytischen Einheit und/oder N_s statt, wie dies für eine N_s-vermittelte Stimulation postuliert wurde (Drummond 1981).

Ganz im Gegensatz dazu stand zunächst die Wirkung von Diamid auf cAMP-Spiegel isolierter Langerhansscher Inseln, die durch Forskolin stark erhöht waren:
Die Forskolin-Stimulation wurde durch das Thioloxidans noch immens verstärkt, während eine Glucagon-induzierte Stimulation unbeeinflußt blieb (Ammon/Müller/ Trier 1985). Daß Diamid in dieser niedrigen Konzentration (0.1 mM) nicht zu einem Absinken des cAMP-Gehalts führte, konnte bei 5.6 mM Glucose durch die Anwesenheit eines physiologischen thiolregenererienden Systems erklärt werden, das kritische Thiolgruppen der katalytischen Einheit im reduzierten Zustand hält. Dies galt aber nicht für die Potenzierung der Forskolinstimulation.
Denkbar war nun eine direkte Interaktion des Thioloxidans mit anderen Komponenten der Adenylatcyclase.

Von einer vergleichbaren Steigerung des Forskolineffektes durch das Thiolalkylans NEM berichteten Seamon und Wetzel (1984). Jakobs (1982) und Harden (1982) hatten zuvor gezeigt, daß NEM in niedriger Konzentration (0.1 mM) N_i-vermittelte Hemmungen in Thrombozyten bzw. Herzmuskelzellen blockieren kann.
Wenn das inhibitorische N-Protein möglicherweise den Schlüssel

für die potenzierende Wirkung von Diamid auf eine Forskolin-stimulation des cAMP-Spiegels in Pankreasinseln darstellte, mußte dieses Thioloxidans auch in Membranpräparationen Langerhansscher Inseln ein aktiviertes N_i-Protein in seiner Funktion zumindest abschwächen.

Um das N_i-Protein in den aktiven Zustand zu bringen, sind folgende Möglichkeiten bekannt:

- Zusatz eines inhibitorischen Hormons, das nach Bindung an seinen spezifischen Rezeptor über die Aktivierung von N_i zur Hemmung der katalytischen Einheit führt. Dazu muß natürlich GTP anwesend sein.
- Direkte Aktivierung von N_i durch GTP, der aber im Basalzustand eine Aktivierung von N_s vorausgeht. Unter stimulatorischem Einfluß von z.B. Forskolin führen niedrige GTP-Konzentrationen aber zuerst zu einer Aktivierung von N_i (Jakobs 1984). Dieser inhibitorische Effekt wird verstärkt durch inhibitorische Hormone oder bei Verwendung der kaum durch die GTPase spaltbaren GTP-Analoga GppNHp bzw. GTPγS (Insel 1982, Seamon 1982).

Wie unter 5.1.2.1. gezeigt, führt GppNHp auch in Membranfraktionen Langerhansscher Inseln in einem niedrigen Dosisbereich zu einer Hemmung der Forskolin-stimulierten AC-Aktivität. In Abwesenheit von Forskolin dagegen resultierte der Zusatz von GppNHp in einer dosisabhängigen schwachen Stimulation der Adenylatcyclase (5.1.1.2.).
Dieses Ergebnis wurde in Thrombozyten als Hinweis für die Existenz eines inhibitorischen N-Proteins gewertet (Seamon/Daly 1982), das in der Langerhansschen Insel von Katada (1981) und Malaisse (1984a) nachgewiesen wurde.

Dieses Resultat zeigt außerdem, daß die Wirkung von Forskolin auch inhibitorischen Einflüssen durch N_i unterliegt.

Eine Hemmung der Forskolin-Stimulation durch GppNHp war allerdings nach Vorbehandlung und bei anschließender Anwesenheit von Diamid nicht mehr zu beobachten (5.1.2.3.). Dies war, wie schon erwähnt, von einer sehr deutlichen Abnahme der Enzymaktivität begleitet.

Eine Bestätigung erfuhren diese Resultate durch Untersuchungen von Jakobs (persönliche Mitteilung 1986), der ebenfalls feststellte, daß Diamid die Hemmung der Thrombozyten-Adenylatcyclase durch GTPγS bzw. das inhibitorische Hormon Adrenalin beseitigen bzw. stark abschwächen konnte.

Dies legt die Schlußfolgerung nahe, daß das Thioloxidans Diamid in niedrigen Konzentrationen, die basale ATP- und cAMP-Spiegel der isolierten Insel nicht beeinflussen, das inhibitorische N-Protein zu blockieren vermag.

Dabei muß in Membranfraktionen Langerhansscher Inseln im Gegensatz zur intakten Inselzelle in Abwesenheit eines thiolregenerierenden Systems mit der Oxidation katalytischer Thiolgruppen gerechnet werden.

Da neben Diamid auch NEM in der isolierten pankreatischen Insel die Forskolin-Stimulation auf den cAMP-Gehalt in gleichem Maße potenzierte (Ammon/Müller/Trier 1985), war es von Interesse herauszufinden, ob dieses Thiolalkylans die gleiche Wirkungsqualitäten wie Diamid aufweisen würde, wie an Thrombozyten gezeigt worden war (Jakobs 1982 und Harden 1982).

Auch hier ist es erforderlich, zwischen den Wirkungen niedriger

und höherer NEM-Konzentration zu differenzieren. In Truthahn-Erythrocyten war 1 mM NEM in der Lage, mit SH-Gruppen des stimulierten N_s-Proteins zu reagieren, wodurch die Abdissoziation des Hormon-Rezeptor-Komplexes von N_s nicht mehr möglich war und somit eine Stimulation durch Isoproterenol nicht mehr stattfinden konnte (Korner 1982). Im Basalzustand lagen dagegen kritische Thiolgruppen von N_s noch geschützt ("eingebettet") vor, so daß sie einem Angriff von Thioloxidantien nicht zugänglich waren.
Die Inaktivierung des inhibitorischen N-Proteins durch NEM zeigte sich aber bereits bei einer Dosis von 0.1 mM (Jakobs 1982).
Allerdings wurde die Blockade einer GppNHp-induzierten Hemmung in Membranfraktionen von Thrombozyten erst in NEM-Konzentrationen von mehr als 0.1 mM (Seamon und Wetzel 1984) bzw. 1 mM (Aktories und Jakobs 1982) beschrieben. Auch eine Hemmung, die GTPγS hervorgerufen hatte, war durch das für die Inaktivierung von N_i sehr spezifische Toxin IAP nicht aufzuheben, während Pertussis-toxin eine von GTP + Somatostatin (als verstärkendes inhibitorisches Hormon) induzierte Hemmung vollständig blockierte (Aktories 1983b). Gleiches wurde mit 0.1 mM NEM festgestellt (Aktories 1983a).
Diese Resultate an Thrombozyten entsprachen unseren Beobachtungen an Membranpräparationen pankreatischer Inseln, daß 0.1 mM NEM zwar eine von GppNHp verursachte Hemmung kaum beeinträchtigte (5.1.2.4.), dagegen eine GTP/Somatostatin-bedingte Inhibition durch dieselbe NEM-Konzentration völlig aufgehoben wurde (5.1.2.5.).
Aktories und Jakobs (1983b) diskutierten, daß stabile GTP-Analoga eine Konformationsänderung von N_i bewirken, was zu einer anhaltenden Adenylatcyclase-Inhibition führt. Diese Konformation

erschien gegenüber Thioloxidation etwas stabiler zu sein.
Daß NEM im Vergleich zu Diamid möglicherweise etwas weniger potent ist, darauf lassen jüngste Untersuchungen des cAMP-Gehaltes Langerhansscher Inseln schliessen, bei denen NEM konzentrationsabhängig Forskolin-stimulierten Inseln zugesetzt wurde (Ammon/Anazodo 1986, unveröffentlicht).

Einfluß von Thiouracilderivaten auf die AC-Aktivität Langerhansscher Inseln.
Als von Ammon et al. (1984d) festgestellt wurde, daß Thioharnstoffderivate die durch 11.1 mM Glucose induzierte Insulinsekretion steigerten, trat die Frage nach ihrem Wirkungsmechanismus auf. Da umfangreiche Untersuchungen insbesondere hinsichtlich evtl. veränderter Ionenfluxe auf eine Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern deuteten, lag eine Beteiligung von cAMP nahe, das laut Wollheim/Sharp (1981) ja in der Lage ist, Ca^{2+}-Ionen aus Mitochondrien zu mobilisieren. Tatsächlich führten Methylthiouracil (MTU) und in etwas stärkerem Maße Propylthiouracil (PTU) zu einer Zunahme des zyklischen Nukleotids in isolierten Ratteninseln (Müller 1985). Da dieser Effekt auch in Ca^{2+}-freiem Medium zu beobachten war, wurde eine indirekte Aktivierung der Adenylatcyclase durch Calcium-Calmodulin, entsprechend der Glucosewirkung, ausgeschlossen.
Nun zeigte das bisher potenteste Thiouracilderivat PTU in zwei verschiedenen Konzentrationen keinerlei Tendenzen einer stimulatorischen Wirkung auf die AC-Aktivität, eher wurde die Enzymaktivität negativ beeinflußt (5.1.3.). Eine direkte Stimulation der Adenylatcyclase durch PTU kann somit in diesem

Dosisbereich ausgeschlossen werden.

Es ist anhand dieser Daten natürlich hypothetisch zu spekulieren, auf welche Art und Weise Thioharnstoffderivate zu einem cAMP-Anstieg in der Inselzelle führen, und ob dieser Schritt der Freisetzung cytosolischen Calciums vorangeht bzw. diese sogar initiiert. Theoretisch denkbar wäre noch eine Hemmung der cAMP-Phosphodiesterase beim Thioharnstoff-vermittelten Anstieg des cAMP-Gehaltes und der Mobilisierung cytosolischen Calciums. Weitere Untersuchungen sind aber noch erforderlich.

6.4. Funktioneller Vergleich der Adenylatcyclase-Systeme in Langerhansschen Inseln und RIN-A2-Zellen; Aspekte ihrer Thiol-abhängigkeit.

Die seit 1985 in unserem Labor etablierte insulinsezernierende Tumorzellinie RIN-A2 ("rat insulinoma") sollte, wie unter 1.2.2. einleitend geschildert, auf die Existenz und Funktion eines Adenylatcyclase-Systems untersucht werden. Da bisher zwar Daten über Messungen des cAMP-Gehaltes in RIN-Zellen vorlagen (Korman/Bhatena 1985), konnte angenommen werden, daß eine aktive Adenylatcyclase auch in RIN-Zellen existierte, eine Bestimmung der Enzymaktivität war aber noch nicht dokumentiert.

Wie unter 5.2.1. beschrieben, ist auch in groben Membranpräparationen von RIN-A2-Zellen eine basale AC-Aktivität feststellbar, die mit einem starken Anstieg auf den Zusatz der Stimulatoren NaF und Forskolin reagierte. Sowohl die basalen als auch die stimulierten Werte lagen im Vergleich zur Enzymaktivität Langerhansscher Inseln bei RIN-A2-Zellen aber weitaus höher, wenn das gebildete cAMP - wie üblich - auf mg Protein bezogen wurde.

Diese Daten belegen klar, daß auch Membranfraktionen von RIN-A2-Zellen ein AC-System aufweisen, das auf stimulatorische Reize ansprechbar ist.

Eine tatsächlich höhere basale Enzymaktivität in RIN-A2-Zellen kann aber nur mit gewissen Vorbehalten angenommen werden, da nichts über das Verhältnis des Adenylatcyclase-Anteils zum Proteingehalt der Membranfraktion bekannt ist. Auch Unterschiede bei der Gewinnung der Membranfraktionen müssen in Betracht gezogen werden: Während Langerhanssche Inseln dem Isolationsprozess durch Collagenase-Verdauung unterzogen werden, sind RIN-A2-Zellen am Versuchstag weder Collagenase noch Trypsin ausgesetzt. Das bedeutet, daß mit einer eventuellen Vorschädigung Langerhansscher Inseln kalkuliert werden kann (Siegel/Creutzfeldt 1986).

Auch die absolute Zunahme der Enzymaktivität auf Stimulationsreize ist bei RIN-A2-Zellen weitaus grösser. Setzt man aber die stimulierten AC-Aktivitäten in Relation zur Basalaktivität, ergeben sich bei RIN-A2-Zellen und Langerhansschen Inseln ganz ähnliche Verhältniswerte. Dies gilt sowohl für Natriumfluorid als auch für Forskolin.

Anhand der Thioloxidantien Diamid und NEM konnte gezeigt werden, daß auch die Adenylatcyclase von RIN-A2-Zellen mit einer Abnahme ihrer Aktivität reagiert, wenn kritische Thiolgruppen oxidiert werden.

Wie die dosisabhängige Abnahme der Forskolin-stimulierten AC-Aktivität bereits ab 0.1 mM NEM zeigt (5.2.2.1.), wird wie in Membranfraktionen Langerhansscher Inseln der Effekt des potenten Stimulators Forskolin durch Inaktivierung wahrscheinlich

katalytischer Thiole vermindert.

Auch die basale und NaF-stimulierte AC-Aktivität von RIN-A2-Zellen wurde durch das Thioloxidans Diamid gesenkt (5.2.2.3.). Besondere Beachtung verdient hierbei die Tatsache, daß die absolute Zunahme der AC-Aktivität durch NaF in Anwesenheit des Thioloxidans fast genauso hoch lag wie in dessen Abwesenheit. Das könnte bedeuten, daß eine direkt über N_s vermittelte Stimulation der Adenylatcyclase kaum durch Thioloxidantien (in dieser Konzentration) beeinflußt wird.

Ähnliches berichteten Drummond et al. (1981) von der Adenylatcyclase in Herzmuskelzellen. Sie fanden eine Abnahme der NaF- oder GppNHp-stimulierten AC-Aktivität durch Thioloxidantien (z.B. NEM), die parallel zu den Basalwerten verlief. Erst NEM-Konzentrationen von ca. 1.5 mM konnten die NaF-Stimulation zunichte machen. Sie schlossen u.a. daraus, daß diese Thioloxidantien in erster Linie mit katalytischen SH-Gruppen der Adenylatcyclase reagierten.

Auch Lin et al. (1980) beobachteten, daß organische Quecksilberreagentien erst in Konzentrationen von 1 mM und mehr eine Stimulation der Adenylatcyclase von HeLa-Zellen durch Guaninnukleotide oder Fluorid verhindern konnten, während eine Inaktivierung des Enzyms im Basalzustand bereits im Bereich bis zu 0.1 mM stattfand. Nur diese Hemmung im unteren Dosisbereich war durch Zusatz von DTT reversibel, was tatsächlich auf die Beteiligung von Thiolen schließen ließ.

Ebenso wie bei Langerhansschen Inseln wurde in Membranpräparationen von RIN-A2-Zellen ein indirekter Beweis für die Existenz eines N_i-Proteins dadurch geliefert, daß GppNHp zu einer Hemmung

der Forskolin-stimulierten AC-Aktivität führte (5.2.2.2.).
Diese über ein aktives N_i-Protein vermittelte Hemmung konnte in Anwesenheit von 0.25 mM und 0.5 mM NEM nicht mehr beobachtet werden (5.2.2.2.); NEM-Konzentrationen, die in Abwesenheit eines thiolregenerierenden Systems bereits zu einer deutlichen Abnahme der katalytischen Aktivität führten (5.2.2.1.).
Daraus und aus den Daten mit 0.1 mM NEM an Langerhansschen Inseln (5.1.2.4. und 5.1.2.5.) kann geschlossen werden, daß eine GppNHp-induzierte Hemmung der Adenylatcyclase zwar so stabil ist, daß 0.1 mM NEM diese Hemmung nicht beseitigen kann, dies aber eine Dosisfrage darstellt, d.h. höhere Konzentrationen des Thiolalkylans durchaus diese Inhibition blockieren können.

Spätestens hier könnte eingeworfen werden, daß beide, Langerhanssche Inseln und RIN-A2-Zellen, zwar insulinsezernierende Eigenschaften aber doch auch funktionelle Unterschiede aufweisen, zumal es sich im zweiten Fall um Tumorzellen handelt, die sicherlich zum Teil Entartungstendenzen besitzen. Eine gleichzeitige Diskussion der an diesen Geweben erhaltenen Resultate wäre unter diesem Aspekt kritisch.
Dagegen kann argumentiert werden, daß bei der Betrachtung eines Einzelparameters wie der AC-Aktivität diese Einschränkung nicht gelten muß. Entscheidende Befunde zum Aufbau und zur Funktion der Adenylatcyclase wurden ja an S49 Lymphoma-Zellen ermittelt (Seamon 1981, Darfler 1982). Eine Vielzahl von Publikationen bestätigte zudem, daß das Adenylatcyclase-System in fast allen Geweben strukturell gleich aufgebaut ist (Abb. 1.8.).

Auch in RIN-A2-Zellen hat es den Anschein, als ob das AC-System in seinen Komponenten dem Enzymsystem in Langerhansschen Inseln entspricht, d.h. zumindest über eine katalytische Einheit, ein stimulatorisches und ein inhibitorisches N-Protein verfügt. Indirekte Beweise dafür sind die nach Forskolin- und NaF-Zusatz aufgetretene Stimulation bzw. die nach GppNHp-Zugabe beobachtete Hemmung.

Demzufolge sind aufgrund des fast unbegrenzten RIN-Zellenmaterials diese Tumorzellen hervorragend geeignet, Untersuchungen der AC-Aktivität in insulinsezernierenden Zellen durchzuführen.

Faßt man die vorliegenden Resultate zusammen, kann die Potenzierung der Forskolin-stimulierten cAMP-Bildung durch Thioloxidantien in der isolierten Langerhansschen Insel jetzt mit einer spezifischen Oxidation von Thiolgruppen erklärt werden, die in Verbindung mit dem inhibitorischen N-Protein stehen. Dadurch soll in der intakten Inselzelle die Wirkung von N_i blockiert werden.

Es scheint darüberhinaus, daß in intakten Inselzellen Thiole des N_i-Proteins gegenüber Thioloxidantien sensitiver sind als SH-Gruppen des N_s-Proteins und/oder der katalytischen Einheit. Dagegen werden in Abwesenheit von Reduktionsäquivalenten, also z.B. DTT, in Membranfraktionen Langerhansscher Inseln oder von RIN-A2-Zellen bereits bei niedriger Diamid-Konzentration vermutlich Thiole der katalytischen Einheit oxidiert und damit inaktiviert. Thiolgruppen, die im Zusammenhang mit N_s stehen, sind dagegen wohl etwas stabiler gegenüber einer Inaktivierung durch Thiolreagentien.

Zum Wirkungsmechanismus des Forskolins:

Die überaus starke Stimulation der AC-Aktivität durch Forskolin wurde durch Thioloxidantien in Konzentrationen von 0.1 bis 0.5 mM vermindert (5.1.2.2. und 5.2.2.1.). Möglicherweise wird dadurch die Forskolininteraktion mit der katalytischen Einheit behindert, wie Forskolinbindungsstudien zeigten, bei denen eine Abnahme der Bindungsstellen für Forskolin durch NEM (in Konzentrationen ab 0.1 mM bis 0.5 mM) an Rattenhirnmembranen festgestellt wurde. Seamon und Daly (1985) folgerten daraus, daß die Forskolin-"High-Affinity"-Bindungsstellen an der katalytischen Einheit empfindlich gegenüber der Blockade von Sulfhydrylgruppen sind.

Reduktionsäquivalente (DTT) in weit höherer Konzentration (bis 10 mM) konnten die Forskolinstimulation weder verstärken noch vermindern (5.2.3.). Dies deutet darauf hin, daß bei der Forskolinstimulation unter den beschriebenen Testbedingungen kritische Thiolgruppen an der katalytischen Einheit im reduzierten Zustand vorliegen. Dies ist auch für einen optimalen Stimulationsvorgang erforderlich.

Unsere mit Forskolin und Thioloxidantien erhaltenen Daten zum cAMP-Gehalt intakter Inseln (Ammon /Miller/Trier 1985) und zur AC-Aktivität Langerhansscher Inseln und von RIN-A2-Zellen legen nahe, daß die Forskolin-Stimulation in insulinsezernierenden Zellen einem negativen Einfluß von N_i unterliegt.
Weiterhin könnte geschlußfolgert werden, daß Forskolin nicht nur die katalytische Einheit stimuliert und dabei N_s miteinbezieht, sondern auch die Wirkung von N_i auf die katalytische Einheit in einer bisher noch unbekannten Weise verändert.

7. ZUSAMMENFASSUNG

7.1. Fragestellung

a) Zunächst mußte eine Methodik zur Messung der Adenylatcylase-Aktivität erstellt und die Funktionsfähigkeit dieses Enzymsystems erbracht werden. Diese Methodik der Membranpräparation und des Adenylatcyclase-Tests sollte auch bei RIN-A2-Zellen angewandt und dementsprechend modifiziert werden.

b) Im weiteren war der Bedeutung von Thiolen bei der Regulation der Adenylatcyclase-Aktivität nachzugehen. Dazu sollte anhand von Thioloxidantien untersucht werden, ob SH-Gruppen maßgeblich entweder bei der Stimulation oder bei der Inhibition des Enzyms beteiligt sind.

c) Zu diesem Zweck mußten zuvor verschiedene Stimulatoren der Adenylatcyclase wie Forskolin oder NaF getestet und das Enzym über eine Aktivierung von N_i gehemmt werden.

d) Getrennt davon sollte festgestellt werden, ob das Thiouracil-derivat PTU über eine direkte Aktivierung der Adenylatcyclase zu erhöhten cAMP-Spiegeln in der isolierten Insel führte.

e) Der letzte Teil der experimentellen Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, ob in "rat-insulinoma"(RIN-A2)-Zellen ein aktives Adenylatcyclase-System existierte, und ob diese Zellen ein geeignetes Modell für Untersuchungen des AC-Systems darstellen. Zudem sollte auch hier einer Beteiligung von Thiolen beim Regulationsmechanismus nachgegangen werden.

7.2. Ergebnisse

a) Es wurde eine Methodik der Membranpräparation und des Adenylatcyclasetests entwickelt, die Messungen der AC-Aktivität sowohl in Langerhansschen Inseln der Ratte als auch in RIN-A2-Zellen ermöglichte. Die Funktionsfähigkeit des Enzyms in diesem Test wurde durch den Stimulator Natriumfluorid nachgewiesen.

Langerhanssche Inseln:

b) Forskolin führte konzentrationsabhängig zu einer Zunahme der AC-Aktivität, die bei 100 uM noch nicht ihren Maximalwert erreicht hatte.

c) Das stabile GTP-Analog GppNHp stimulierte dosisabhängig die basale Enzymaktivität, während es die Forskolin-induzierte Aktivitätszunahme in niedriger Konzentration (1 uM) verminderte.

d) Diamid (0.1 mM) blockierte diese GppNHp-induzierte Hemmung, senkte aber gleichzeitig die basale und Forskolin-stimulierte AC-Aktivität deutlich.

e) NEM (0.1 mM) verhinderte eine durch GTP und Somatostatin hervorgerufene Hemmung, zeigte diesen Effekt aber nicht bei einer GppNHp-induzierten Hemmung.

f) Propylthiouracil (PTU) konnte keine Zunahme der AC-Aktivität bewirken.

RIN-A2-Zellen:

g) Auch in Membranpräparationen von RIN-A2-Zellen wurde eine messbare AC-Aktivität festgestellt, die im Vergleich der basalen Absolutwerte deutlich höher als in Inselmembranfraktionen lag.

h) Dieses Enzym war durch Forskolin (100 uM) und NaF (10 mM) stark stimulierbar. Absolut gesehen fiel diese Stimulation grösser aus als bei Langerhansschen Inseln.

i) NEM führte zu einer dosisabhängigen Abnahme der Forskolin-stimulierten AC-Aktivität. Eine GppNHp-induzierte Hemmung der Forskolinstimulation wurde durch 0.25 mM und auch durch 0.5 mM NEM blockiert.

k) Diamid verminderte die basale und die NaF-stimulierte AC-Aktivität etwa um den gleichen Absolutwert.

l) DTT hatte in Konzentrationen bis zu 10 mM keinen Einfluß auf die Forskolin-stimulierte Enzymaktivität.

7.3. Schlußfolgerungen

Zur Methodik:

a) Die hier beschriebene Methode der Membranpräparation und des AC-Tests ist geeignet, Messungen der Adenylatcyclase-Aktivität von Langerhansschen Inseln und RIN-A2-Zellen durchzuführen.

b) Membranfraktionen aus RIN-A2-Zellen scheinen ein gutes Modell für die Untersuchung der AC-Aktivität insulinsezernierender Zellen zu sein, da sie über ein Adenylatcyclase-System verfügen, das in seiner Stimulier- und Inhibierbarkeit der Adenylatcyclase in Langerhansschen Inseln der Ratte entspricht.

Zur Bedeutung von Thiolgruppen bei der Regulation der Adenylatcyclase-Aktivität:

c) Thiole spielen auch bei der Regulation der Adenylatcyclase eine Rolle, denn Thioloxidantien führen in Abwesenheit eines thiolreduzierenden Sytems zu einer Abnahme der katalytischen Aktivität der Adenylatcyclase, gleichgültig ob dieses sich im Basalzustand befindet oder durch Forskolin stimuliert wurde.

d) NEM und Diamid in niedriger Konzentration sind in der Lage, N_i-vermittelte Wirkungen auf die katalytische Einheit zu blockieren. Daraus wird auf die Existenz sensitiver Thiole in Verbindung mit N_i geschlossen.

e) Thiole von N_s scheinen nicht in vergleichbarer Weise gegenüber Oxidation empfindlich zu sein.

f) Das Thiouracilderivat PTU führt nicht über eine direkte Aktivierung der Adenylatcyclase zu einem Anstieg von intrazellulärem cAMP in der Langerhansschen Insel.

Zur Forskolinwirkung:

g) Forskolin stimuliert auch in der Langerhansschen Insel die Adenylatcyclase direkt.

h) Die stimulatorische Wirkung von Forskolin kann durch ein aktives N_i-Protein gehemmt werden.

i) Forskolin modifiziert in irgendeiner Form auch die Wirkung des inhibitorischen N-Proteins auf die Adenylatcyclase.

k) Die Forskolin-Stimulation kann zwar durch Thioloxidantien vermindert aber nicht durch Reduktionsäquivalente (DTT) in millimolaren Mengen verstärkt werden.

8. LITERATURVERZEICHNIS

Abrahamson, H., Rorsman, P. (1984)
Cyclic AMP potentiation of insulin release from pancreatic ß cells is not mediated by an increased cytosolic Ca^{2+} activity.
Diabetologia 27, 250A (Abstract 1)

Agren, A., Berne, C., Brolin, S.E. (1978)
The activity of glutathion reductase in A_2-cell and B-cell-rich pancreatic islets.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 427-429

Ahren, B., Lundquist, I. (1981)
Effects of two cholecystokinin variants CCK-39 and CCK-8 on basal and stimulated insulin secretion.
Acta Diabet. Lat. 18, 345-356

Aktories, K., Schultz, G., Jakobs, K.H. (1982)
Inactivation of the guanine nucleotide regulatory site mediating inhibition of the adenylate cyclase in hamster adipocytes.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 321, 247-252

Aktories, K., Schultz, G., Jakobs, K.H. (1983a)
Somatostatin-induced stimulation of a high-affinity GTPase in membranes of S49 lymphoma cyc^- and H21 variants.
Mol. Pharmacol. 24, 183-188

Aktories, K., Schultz, G., Jakobs, K.H. (1983b)
Adenylate cyclase inhibition and GTPase stimulation by somatostatin in S49 lymphoma cyc^- variants are prevented by islet-activating protein.
FEBS Lett. 158, 169-173

Ammon, H.P.T., Steinke, J. (1972)
6-Aminonicotinamide (6-AN) as a diabetogenic agent. In vitro and in vivo studies in the rat.
Diabetes 21, 143-148

Ammon, H.P.T. (1975)
Physiologische und pharmakologische Aspekte der Insulinsekretion.
Dt. Apothek. Z. 39, 1472-1477

Ammon, H.P.T., Verspohl, E.J. (1976)
Pyridine nucleotides in pancreatic islets during inhibition of insulin release by exogenous insulin.
Endocrinology 99, 1469-1476

Ammon, H.P.T., Hoppe, E., Akhtar, M.S., Niklas, H. (1979)
Effect of leucine on the pyridine nucleotide contents of islets and on the insulin released-interactions in vitro with methylen blue, thiol oxidants and p-chloromercuribenzoate.
Diabetes 28, 593-599

Ammon, H.P.T., Grimm, A., Lutz, S., Wagner-Teschner, D., Händel, M., Hagenloh, I. (1980a)
Islet glutathion and insulin release.
Diabetes 29, 830-834

Ammon, H.P.T., Hägele, R., Youssif, N. (1980b)
Inhibition of calcium uptake of rat pancreatic islets by thiol oxidants.
62nd Annual Meeting of the Endocrine Society, Washington DC (Abstract F 783)

Ammon, H.P.T., Heinzl,S., Abdel-Hamid, M., Kallenberger, H.-M., Hagenloh, I. (1982)
Effect of diamide and reduced glutathione on the elevated levels of cyclic AMP in rat pancreatic islets exposed to glucose, p-chloromercuribenzoate and aminophylline.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 319, 243-248

Ammon, H.P.T., Hägele, R., Youssif, N., Eujen, R., El-Amri, N. (1983)
A possible role of intracellular and membrane thiols of rat pancreatic islets in calcium uptake and insulin release.
Endocrinology 112, 720-726

Ammon, H.P.T., Abdel-Hamid, M., Rao, P.G., Enz, G. (1984a)
Thiol-dependent and non thiol-dependent stimulators of insulin release.
Diabetes 33, 251-257

Ammon, H.P.T., Hehl, K.H., Enz, G., Setiadi-Ranti, A. (1984b)
In vitro potentiation of glucose-induced insulin released by thiols - significance of cysteine-compounds.
Diabetologia 27, 252A (Abstract 11)

Ammon, H.P.T., Müller, A.B. (1984c)
Effect of forskolin on islet cyclic AMP, insulin secretion, blood glucose and intravenous glucose tolerance in rats.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm. 326, 364-367

Ammon, H.P.T., Melien, M.C.M., Pfäffle, T. (1984d)
Potentiation of glucose-induced insulin release by thiourea and thiourea derivatives.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 327, 234-237

Ammon, H.P.T., Mark, M. (1985)
Thiols and ß-cell function: A review.
Cell Biochem. Function 3, 157-171

Ammon, H.P.T., Müller, A.B., Trier, J.K. (1985)
Potentiation of forskolin-induced cyclic AMP production in rat pancreatic islets by thiol reagents.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 329, R 69 (Abstract)

Ammon, H.P.T. (1986)
Antidiabetika - was gibt es Neues?
Dt. Apothek. Z. 20, 1013-1018

Anderson, W.B., Estival, A., Tapiovaara, H., Gopalakrishna, R. (1985)
Altered subcellular distribution of proteinkinase C. Possible role in tumor promotion and the regulation of cell growth. Relationship to changes in adenylate cyclase activity.
Adv. Cycl. Nucl. Prot. Phosph. Res. 19, Raven Press, NY (Cooper/ Seamon eds.)

Asano, T., Ui, M., Ogasawara, N. (1985)
Prevention of the agonist binding to γ-aminobutyric acid B receptors by guanine nucleotides and IAP in bovine cerebral cortex.
J. Biol. Chem. 260, 12653-12658

Ashcroft, S.J.H., Randle, P.J. (1970)
Glucose metabolism in mouse pancreatic islets.
Biochem. J. 118, 143-154

Ashcroft, S.J.H., Christie, M.R. (1979)
Effects of glucose on the cytosolic ratio of reduced/oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate in rat islets of Langerhans.
Biochem. J. 184, 697-700

Ashcroft, S.J.H. (1980)
Glucoreceptor mechanisms and the control of insulin release and biosynthesis.
Diabetologia 18, 5-15

Aurbach, G.D. (1982)
Polypeptide and amine hormone regulation of adenylate cyclase.
Annual Rev. Physiol. 44, 653-666

Awad, J.A., Johnson, R.A., Jakobs, K.-H., Schultz, G. (1983)
Interactions of forskolin and adenylate cyclase.
J. Biol. Chem. 258, 2960-2965

Bell, J.D., Buxton, I.L.O., Brunton, L.L. (1985)
Enhancement of adenylate cyclase activity in S49 lymphoma cells by phorbol esters.
J. Biol. Chem. 260, 2625-2628

Berridge, M.J. (1980)
Trends Pharmacol. Sci. 1, 419-424

Berridge, M.J. (1981)
Phosphatidylinositol hydrolysis: a multifunctional transducing mechanism.
Mol. Cell. Endocrinology 24, 141-163

Berridge, M.J. (1982)
Calcium Cell Funct. 3, 1-36, Academic Press, NY (Cheung ed.)

Berridge, M.J. (1984)
Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers.
Biochem. J. 220, 345-360

Best, L., Malaisse, W.J. (1983)
Effects of nutrient secretagogues upon phospholipid metabolism in rat pancreatic islets.
Mol. Cell. Endocrinology 32, 205-214

Best, L., Dunlop, M., Malaisse, W.J. (1984)
Phospholipid metabolism in pancreatic islets.
Experientia 40, 1085-1091

Bhat, S.V., Bajwa, B.S., Dornauer, H., de Souza, N.J. (1977)
Structure and stereochemistry of new labdane diterpenoids from Coleus forskohlii Briq.
Tetrahedron Lett. 19, 1669-1672

Bhatena, S.J., Oie, H.K., Gazdar, A.F., Voyles, N.R., Wilkins, S.D., Recant, L. (1982)
Insulin, glucagon, and somatostatin receptors on cultured cells and clones from rat islet cell tumor.
Diabetes 31, 521-531

Biden, T.J., Prentki, M., Irvine, R.F., Berridge, M.J., Wollheim, C.B. (1984)
Inositol 1,4,5-triphosphate mobilizes intracellular Ca^{2+} from permeabilized insulin secreting cells.
Biochem. J. 223, 467-473

Birnbaumer, L. (1985)
Regulation of receptors and adenylyl cyclase by N-proteins.
Adrenergic receptors: Molecular properties and therapeutic implications 160, Schattauer Verlag, NY (Lefkowitz/Lindenlaub eds.)

Bloom, G.D., Hellman, B., Idahl, L.-A., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1972)
Effects of organic mercurials on mammalian pancreatic B-cells. Insulin release, glucose transport, glucose oxidation, membrane permeability and ultrastructure.
Biochem. J. 129, 241-254

Bockaert, J., Cantau, B., Sebben-Perez, M. (1984)
Hormonal inhibition of adenylate cyclase. A crucial role for Mg^{2+}.
Mol. Pharmacol. 26, 180-186

Bockaert, J. (1986)
Vortrag am Pharmazeutischen Institut der Univ. Tübingen im April 1986

Bowen, V., Lazarus, N.R. (1972)
Glucose-mediated insulin release from mouse islets of Langerhans: Cyclic nucleotide phosphodiesterase.
Biochem. J. 128, 97p

Bradford, M., (1976)
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding.
Analyt. Biochem. 72, 248-254

Brisson, G.R., Malaisse-Lagae, F., Malaisse, W.J. (1972)
The stimulus secretion coupling of glucose-induced insulin release: VII. A proposed site of action for adenosine-3',5'-cyclic monophosphate.
J. Clin. Invest. 51, 232-241

Brooker, G. (1982)
Radioimmunoassay techniques for cyclic nucleotides.
Handbook of Experimental Pharmacology, Cyclic Nucl. I Vol. 58/I, chapter 8, Springer Verlag Berlin/Heidelberg/NY (Nathanson/ Kebabian eds.)

Burr, I.M., Balant, L., Stauffacher, W., Renold, A.E. (1970)
Perifusion of rat pancreatic tissue in vitro: Substrate modification of theophylline induced biphasic insulin release.
J. Clin. Invest. 49, 2097-2105

Capito, K., Hedeskov, C.J. (1974)
Effects of starvation on phosphodiesterase activity and the content of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in isolated mouse pancreatic islets.
Biochem. J. 142, 653-658

Capito, K., Hedeskov, C.J. (1977)
Effects of glucose, glucose metabolites and calcium ions on adenylate cyclase activity in homogenates of mouse pancreatic islets.
Biochem. J. 162, 569-573

Cassel, D., Selinger, Z. (1977)
Mechanisms of adenylate cyclase activation by cholera toxin: Inhibition of GTP hydrolysis at the regulatory site.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 3307-3311

Cech, S.Y., Broaddus, W.C., Maguire, M.E. (1980)
Adenylate cyclase: The role of magnesium and other divalent cations.
Mol. Cell. Biochem. 33, 67-92

Cerasi, E., Luft, R. (1972)
Clinical diabetes and theories of pathogenesis.
Handbook of Physiology, sect. 7 Endocrin., vol. I, Endocrine pancreas, 627-640. , Am. Physiol. Soc., Washington DC (Steiner/ Freinkel eds.)

Charles, M.A., Fanska, R., Schmid, F.G., Forsham, P.H., Grodsky, G.M. (1973)
Adenosine-3',5'-monophosphate in pancreatic islets: Glucose-induced insulin release.
Science 179, 569-571

Charles, M.A., Lawecki, J., Pictet, R., Grodsky, G.M. (1975)
Insulin secretion. Interrelationships of glucose, cyclic adenosine-3',5'-monophosphate and calcium.
J. Biol. Chem. 250, 6134-6140

Chick, W.L., Warren, S., Chute, R.N., Like, A.A., Lauris, V., Kitchen, K.C. (1977)
A transplantable insulinoma in the rat.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 628-632

Clements, R.S., Rhoten, W.B., Starnes, W.R. (1977)
Subcellular localisation of the alterations in phosphatidyl-inositol metabolism following glucose-induced insulin release from rat pancreatic islets.
Diabetes 26, 1109-1116

Codina, J., Hildebrandt, J.D., Iyengar, R., Birnbaumer, L., Sekura, P.D., Manclark, C.R. (1983)
Pertussis toxin substrate, the putative N_i component of adenylyl cyclases, is an $\alpha\beta$ heterodimer regulated by guanine nucleotide and magnesium.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4276-4280

Codina, J., Hildebrandt, J.D., Sekura, P.D., Birnbaumer, M., Bryon, J., Manclark, C.R., Iyengar, R., Birnbaumer, L. (1984)
N_s and N_i, the stimulatory and inhibitory regulatory component of adenylyl cyclases.
J. Biol. Chem. 259, 5871-5886

Colca, J.R., Brooks, C.L., Landt, M., McDaniel, M.L. (1983)
Correlation of Ca^{2+}- and calmodulin-dependent protein kinase activity with secretion of insulin from islets of Langerhans.
Biochem. J. 212, 819-827

Cooper, R.H., Ashcroft, S.J.H., Randle, P.J. (1973)
Concentration of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in mouse pancreatic islets measured by a protein-binding radioassay.
Biochem. J. 134, 599-605

Cooper, D.M.F. (1982)
Bimodal regulation of adenylate cyclase.
FEBS Lett. 138, 157-163

Curry, D.L., Bennett, L.L., Grodsky, G.M. (1968)
Requirement for calcium ion in insulin secretion by the perfused rat pancreas.
Am. J. Physiol. 214, 174-178

Czech, M.P., Lawrence, J.C., Lynn, W.S. (1974)
Evidence for the involvement of sulfhydryl oxidation in the regulation of fat cell hexose transport by insulin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 4173

Daly, J.W. (1984)
Forskolin, adenylate cyclase, and cell physiology: an overview.
Adv. Cycl. Nucl. Prot. Phosphor. Res. 17, 81-89, Raven Press, NY
(Greengard ed.)

Darfler, F.J., Mahan, L.C., Koachman, A.M., Insel, P.A. (1982)
Stimulation by forskolin of intact S49 lymphoma cells involves
the nucleotide regulatory protein of adenylate cyclase.
J. Biol. Chem. 257, 11901-11907

Dean, P.M. (1975)
Exocytosis modelling: an electrostatic function for calcium in
stimulus-secretion coupling.
J. Theor. Biol. 54, 289-308

Devis, G., Somers, G., Malaisse, W.J. (1977)
Dynamics of calcium-induced insulin release.
Diabetologia 13, 531-536

Drummond, G.I., (1981)
Inactivation of cardiac adenylate cyclase by oxidation,
trivalent arsenicals, and N-ethylmaleimide.
Arch. Biochem. Biopys. 211, 30-38

Fain, J.N., Garcia-Sainz, J.A. (1980)
Role of phosphatidylinositol turnover in alpha$_1$ and of adenylate
cyclase inhibition in alpha$_2$ effects of catecholamines.
Life Sciences 26, 1183-1194

Ferry, N., Adnot, S., Bordosi, A., Lacombe, M.-L., Guellaen, G.,
Hanoune, J. (1982)
Uncoupling by proteolysis of alpha adrenergic receptor-mediated
inhibition of adenylate cyclase in human platelets.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 108, 708-714

Fex, G., Lernmark, A. (1972)
Effect of D-glucose on the incorporation of ^{32}P into phospho-
lipids of mouse pancreatic islets.
FEBS Lett. 25, 287-291

Frandsen, E.K., Krishna, G. (1976)
A simple ultrasensitive method for the assay of cyclic AMP and
cyclic GMP in tissues.
Life Sciences 18, 529-541

Gazdar, A.F., Chick, W.L., Oie, H.k., Sims, H.L., King, D.L., Weir, G.C., Lauris, V. (1980)
Continuous, clonal insulin-, and somatostatin-secreting cell lines established from a transplantable rat islet cell tumor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3519-3523

Gill, D.M., Meren, R. (1983)
A second guanyl nucleotide-binding site associated with adenylate cyclase.
J. Biol. Chem. 258, 11908-11914

Gilman, A.G. (1970)
A protein binding assay for adenosine 3' ,5' cyclic-monophosphate.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67, 305-312

Goldfine, I.D., Perlman, R., Roth, J. (1971)
Inhibition of cyclic 3',5'-AMP phosphodiesterase in islet cells and other tissues by tolbutamide.
Nature 234, 295-297

Gorman, R.E., Bitensky, M.W. (1970)
Selective activation by short chain alcohols of glucagon responsive adenyl cyclase in liver.
Endocrinology 87, 1075-1081

Grill, V., Cerasi, E. (1976)
Effect of somatostatin on insulin secretion induced by ionophor A 23187.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 154, 198-200

Grodsky, G.M., Bennett, L.L. (1966)
Cation requirements for insulin secretion in the isolated perfused pancreas.
Diabetes 15, 910-913

Gylfe, E., Hellman, B. (1981)
Biochem. Med. 26, 365-376

Haga, T., Haga, K., Gilman, A.G. (1977)
Hydrodynamic properties of the ß-adrenergic receptor and adenylate cyclase from wild type and variant S49 lymphoma cells.
J. Biol. Chem. 252, 5776-5782

Hanks, J.H., Wallace, E.R. (1949)
Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71, 196-200

Harden, T.K., Scheer, A.G., Smith, M.H. (1982)
Differential modification of the interaction of cardiac muscarinic cholinergic and beta-adrenergic receptors with a guanine nucleotide binding component(s).
Mol. Pharmacol. 21, 570-580

Harper, J.F., Brooker, G.J. (1975)
Femtomole sensitive radioimmunoassay for cyclic AMP and cyclic GMP after 2'O acetylation by acetic anhydride in aequeous solution.
J. Cycl. Nucl. Res. 1, 207-218

Harrison, D.E., Ashcroft, S.J.H. (1982)
Effects of Ca^{2+}, calmodulin and cyclic AMP on the phosphorylation of endogenous proteins by homogenates of rat islets of Langerhans.
Biochem. Biophys. Acta 714, 313-319

Harrison, D.E., Ashcroft, S.J.H., Christie, M.R., Lord, J.M. (1984)
Protein phosphorylation in the pancreatic B-cell.
Experientia 40, 1075-1084

Heaney, T.P., Larkins, R.G. (1981)
The effect of prostacyclin and 6-keto-prostacyclin F 1α on insulin secretion and cyclic adenosine 3',5' monophosphate content in isolated rat islets.
Diabetes 30, 824-828

Hedeskov, C.J., Capito, K. (1974)
The effect of starvation on insulin secretion and glucose metabolism in mouse pancreatic islets.
Biochem. J. 140, 423-433

Hedeskov, C.J. (1980)
Mechanism of glucose-induced insulin secretion.
Physiol. Rev. 60, 442-509

Hedeskov, C.J., Capito, K., Thams, P. (1983)
Effects of glucose and other secretagogues on the cytosolic ratios of free $NADH/NAD^+$ and free $NADPH/NADP^+$ in mouse pancreatic islets.
Diabetologia 25, 163 (Abstract 164)

Hellman, B., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1971)
Evidence for mediated transport of glucose in mammalian pancreatic beta-cells.
Biochim. Biophys. Acta 241, 147-154

Hellman, B., Idahl, L.-A., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1974a)
The pancreatic ß-cell recognition of insulin secretagogues: Does cyclic AMP mediate the effect of glucose?
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 3405-3409

Hellman, B., Idahl, L.-A., Lernmark, A., Täljedal, I.-B. (1974b)
The pancreatic ß-cell recognition of insulin secretagogues. XIII. Effects of sulphhydryl reagents on cyclic AMP.
Biochim. Biophys. Acta 372, 127-134

Hellman, B. (1976)
Stimulation of insulin release after raising extracellular calcium.
FEBS Lett. 63, 125-128

Henquin, J.C. (1978)
Metabolic control by sugars of the potassium permeability (PK) in pancreatic islet cells.
Diabetologia 15, 239

Henquin, J.C. (1980)
Metabolic control of the potassium permeability in pancreatic islet cells.
Biochem. J. 186, 541-550

Henquin, J.C., Charles, S., Nenquin, M., Mathot, F., Tamagawa, T., (1982)
Diazoxide and D 600. Inhibition of insulin release.
Diabetes 31, 776-783

Henquin, J.C., Schmeer, W., Meissner, H.P. (1983)
Forskolin, an activator of adenylate cyclase, increases Ca^{2+}-dependent electrical activity induced by glucose in mouse pancreatic B-cells.
Endocrinology 112, 2218-2220

Henquin, J.C., Meissner, H.P. (1984)
The ionic, electrical, and secretory effects of endogenous cyclic adenosine monophosphate in mouse pancreatic B-cells: Studies with Forskolin.
Endocrinology 115, 1125-1134

Henquin, J.-C. (1985)
The interplay between cyclic AMP and ions in the stimulus secretion coupling in pancreatic B-cells.
Arch. Int. Physiol. Biochimie 93, 37-48

Houslay, M.D. (1984)
A family of guanine nucleotide regulatory proteins.
Trends Biochem. Sci. 9, 39–40

Howell, S.L., Whitfield, M. (1972)
Cytochemical localisation of adenyl cyclase activity in rat islets of Langerhans.
J. Histochem. Cytochem. 20, 873–879

Howell, S.L., Montague, W. (1973)
Adenylate cyclase activity in isolated rat islets of Langerhans. Effects of agents which alter rates of insulin secretion.
Biochim. Biophys. Acta 320, 44–52

Howell, S.L., Montague, W. (1975)
Regulation by nucleotides of ^{45}calcium uptake in homogenates in rat islets of Langerhans.
FEBS Lett. 52, 48–52

Howell, S.L., Tyhurst, M. (1982)
Microtubules, microfilaments and insulin secretion.
Diabetologia 22, 301–308

Howlett, A.C., Sternweis, P.C., Macik, B.A., van Arsdale, P.M., Gilman, A.G. (1979)
Reconstitution of catecholamine-sensitive adenylate cyclase. Association of a regulatory component of the enzyme with membranes containing the catalytic protein and ß-adrenergic receptors.
J. Biol. Chem. 254, 2287–2295

von Hungen, K., Baxter, C.F. (1982)
Sensitivity of rat brain adenylate cyclase to activation by calcium and ethanol after chronic exposure to ethanol.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 106, 1078–1082

Insel, P.A., Stengel, D., Ferry, N., Hanoune, J. (1982)
Regulation of adenylate cyclase of human platelet membranes by forskolin.
J. Biol. Chem. 257, 7485–7490

Isaacs, I., Brinkley, F. (1977)
Glutathione-dependent control of protein disulfide-sulphhydryl content by subcellular fractions of hepatic tissue.
Biochim. Biophys. Acta 497, 192–204

Iyengar, R., Birnbaumer, L. (1982)
Hormone receptor modulates the regulatory component of adenylate cyclase by reducing its requirement for Mg^{2+} and enhancing its extent of activation by guanine nucleotides.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5179-5183

Jakobs, K.H., Aktories, K., Schultz, G. (1981)
Inhibition of adenylate cyclase by hormones and neurotransmitters.
Adv. Cyclic Nucl. Prot. Phosph. Res. 14, 173-187

Jakobs, K.H., Lasch, P., Aktories, K., Minuth, M., Schultz, G. (1982)
Uncoupling of α-adrenoceptor-mediated inhibition of human platelet adenylate cyclase.
J. Biol. Chem. 257, 2829-2833

Jakobs, K.H., Schultz, G., Gaugler, B., Pfeuffer, T. (1983)
Inhibition of N_s-protein-stimulated human-platelet adenylate cyclase by epinephrine and stable GTP analogs.
Eur. J. Biochem. 134, 351-354

Jakobs, K.H., Aktories, K., Schultz, G. (1984)
Mechanisms and components involved in adenylate cyclase inhibition by hormones.
Adv. Cycl. Nucl. Prot. Phosphor. Res. 17, 135-143, Raven Press, NY (Greengard ed.)

Jakobs, K.H., Bauer, S., Watanabe, Y. (1985)
Modulation of adenylate cyclase of human platelets by phorbol ester.
Eur. J. Biochem. 151, 425-430

Johnson, D.G., Thompson, W.J., and Williams, R.H. (1974)
Regulation of adenylyl cyclase from isolated pancreatic islets by prostaglandins and guanosine 5'-triphosphate.
Biochemistry 13, 1920-1924

Johnson, D.G. (1980):
Stimulatory and inhibitory effects of ATP-regenerating systems on liver adenylate cyclase.
J. Biol. Chem. 255, 17, 8252-8258

Karl, R.C., Zawalich, W.S., Ferrendelli, J.A., Matschinsky, F.M. (1975)
The role of Ca^{2+} and cyclic adenosine 3,5-monophoshate in insulin release induced in vitro by the divalent cation ionophore A 23187.
J. Biol. Chem. 250, 4575-4579

Katada, T., Ui, M. (1981)
In vitro effects of islet-activating protein on cultured rat pancreatic islets. Enhancement of insulin secretion, adenosine 3':5'-monophosphate accumulation and ^{45}Ca flux.
J. Biochem. 89, 979-990

Katada, T., Bokoch, G.M., Northup, J.K., Ui, M., Gilman, A.G. (1984)
The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase.
J. Biol. Chem. 259, 3568-3577

Katada, T., Gilman, A.G., Watanabe, Y., Bauer, S., Jakobs, K.H. (1985)
Protein kinase C phosphorylates the inhibitory guanine-nucleotide-binding regulatory component and apparently suppresses its function in hormonal inhibition of adenylate cyclase.
Eur. J. Biochem. 151, 431-437

Kikuchi, M., Wollheim, C.B., Cuendet, G.S., Renold, A.E., Sharp, G.W.G. (1978)
Studies on the dual effects of glucose in $^{45}Ca^{2+}$ efflux from isolated rat islets.
Endocrinology 102, 1339-1349

Korman, L.Y., Bhathena, S.J., Voyles, N.R., Oie, H.K., Recant, L. (1985)
Characteristics of the interaction of the glucagon receptor, cAMP, and insulin secretion in parent cells and clone 5F of a cultured rat insulinoma.
Diabetes 34, 717-722

Korner, M., Gilon, C., Schramm, M. (1982)
Locking of hormone in the ß-adrenergic receptor by attack on a sulfhydryl in an associated component.
J. Biol. Chem. 257, 3389-3396

Kosower, N.S., Kosower, E.M., Wertheim, B. (1969)
Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 37, 593-596

Kosower, N.S., Kosower, E.M. (1978)
The glutathione status of cells.
Int. Rev. Cytol. 54, 109-160

Kosower, N.S., Zipser, Y., Faltin, Z. (1982)
Membrane thiol-disulfide status in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells. Relationship to cellular glutathione.
Biochim. Biophys. Acta 691, 345-352

Kuo, W., Hodgins, D., Kuo, J.F. (1973)
Adenylate cyclase in islets of Langerhans. Isolation of islets and regulation of adenylate cyclase activity by various hormones and agents.
J. Biol. Chem. 248, 8, 2705-2711

Lacy, P.E., Kostianovsky, M. (1967)
Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas.
Diabetes 16, 35-39

Lacy, P.E., Howell, S.L., Young, D.A., Fink, C.J. (1968)
New hypothesis of insulin secretion.
Nature 219, 1177-1179

Leclerq-Meyer, V., Herchuelz, A., Valverde, I., Couturier, E., Marchand, J., and Malaisse, W.J. (1980)
Mode of action of clonidine upon islet function. Dissociated effects upon the time course and magnitude of insulin release.
Diabetes, Vol. 29, 193-200

Levitan, I.B., Lemos, J.R., Novak-Hofer, I. (1983)
Protein phosphorylation and the regulation of ion channels.
Trends Neurosc. 6, 496-499

Limbird, L.E., Lefkowitz, R. (1977)
Resolution of ß-adrenergic receptor binding and adenylate cyclase activity by gel exclusion chromatography.
J. Biol. Chem. 252, 799-802

Limbird, L.E., Lefkowitz, R. (1978)
Agonist-induced increase in apparent ß-adrenergic receptor size.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 228-232

Limbird, L.E. (1981)
Activation and attenuation of adenylate cyclase.
Biochem. J. 195, 1-13

Lin, M.C., Cooper, D.M.F., Rodbell, M. (1980)
Selective effects of organic mercurials on the GTP-regulatory proteins of adenylate cyclase systems.
J. Biol. Chem. 225, 7250-7254

Lord, J.M., Ashcroft, S.J.H. (1984)
Identification and characterisation of Ca^{2+}-phospholipid-dependent protein kinase in rat islets and hamster B-cells.
Biochem. J. 219, 547-551

MacDonald, M.J., Kowluru, A. (1982)
Calcium-Calmodulin dependent myosin phosphorylation by pancreatic islets.
Diabetes 31, 566-570

Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., Mayhew, D.A. (1967)
Possible role for the adenylcyclase system in insulin secretion.
J. Clin. Invest. 46, 1724-1734

Malaisse, W.J., Pipeleers, D.G., Levy, J. (1974)
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XVI. A glucose-like and calcium-independent effect of cyclic AMP.
Biochim. Biophys. Acta 362, 121-128

Malaisse, W.J., Hutton, J.C., Kawazu, S., Sener, A. (1978)
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Metabolic effects of menadione in isolated islets.
Eur. J. Biochem. 87, 121-130

Malaisse, W.J., Sener, A., Herchuelz, A., Hutton, J.C. (1979)
Insulin release: the fuel hypothesis.
Metabolism 28, 373-386

Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F. (1984)
The role of cyclic AMP in insulin release.
Experientia 40, 1068-1075

Malaisse, W.J., Garcia-Morales, P., Dufrane, S.P., Sener, A. Valverde, I. (1984a)
Forskolin-induced activation of adenylate cyclase, cyclic adenosine monophosphate production and insulin release in rat pancreatic islets.
Endocrinology 115, 2015-2020

Manning, D.R., Gilman, A.G. (1983)
The regulatory components of adenylate cyclase and transducin.
J. Biol. Chem. 258, 7059-7063

Matschinsky, F.M., Ellerman, J.E. (1968)
Metabolism of glucose in the islets of Langerhans.
J. Biol. Chem. 243, 2730-2736

Metz, S.A. (1981)
Feedback modulation of glucose-induced insulin secretion by arachidonic acid metabolites: possible molecular mechanisms and relevance to diabetes mellitus.
Prostaglandins Med. 7, 581-589

Michell, R.H. (1975)
Inositol phospholipids and cell surface receptor function.
Biochim. Biophys. Acta 415, 81-147

Mitrius, J.C., U'Prichard, D.C. (1985)
Regulation of α_2 adrenoreceptors by nucleotides, ions, and agonists: Comparison in cells of neural and nonneural origin.
Adv. Cycl. Nucl. Prot. Phosphor. Res. 19, 57-73, Raven Press, NY (Cooper/Seamon eds.)

Montague, W., Cook, J.R. (1971)
The role of adenosine-3',5'-cyclic monophosphate in the regulation of insulin release by isolated rat islets of Langerhans.
Biochem. J. 122, 115-120

Montague, W., Howell, S.L. (1972)
The mode of action of adenosine-3',5'-cyclic monophosphate in mammalian islets of Langerhans. Preparation and properties of islet-cell protein phosphokinase.
Biochem. J. 129, 551-560

Montague, W., Parkin, E.N. (1980)
Changes in membrane lipids of the ß-cell during insulin secretion.
Horm. Metabol. Res. Suppl. 10, 153-157

Müller, A.B. (1985)
cAMP-Gehalt und Insulinsekretion Langerhansscher Inseln der Ratte. Untersuchungen mit Forskolin, Glucagon und Thiouracil-derivaten.
Dissertation. Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Tübingen.

Mukherjee, S.P., Lynn, W.S. (1977)
Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in adipocyte plasma membrane and its activation by insulin.
Arch. Biochem. Biophys. 184, 69-76

Mukherjee, S.P., Lynn, W.S. (1979)
Role of cellular radox state and glutathione in adenylate cyclase activity in rat adipocytes.
Biochim. Biophys. Acta 568, 224-233

Mukherjee, S.P., Mukherjee, C. (1980)
Regulation of adenylate cyclase-cAMP system in pancreatic islets and its response to insulinotropic stimuli by redox reactions and cellular redox state.
J. Cell. Biol. 87, 172a (abstract)

Mukherjee, S.P., Mukherjee, C. (1984)
Regulation of adenylate cyclase-cAMP system in pancreatic islets and its response to insulinotropic stimuli by redox reactions and cellular redoxstate.
20th Annual Meeting Am. Soc. Cell. Biol. H172a (Abstract H1274)

Murayama, T., Katada, T., Ui, M. (1983)
Guanine nucleotide activation and inhibition of adenylate cyclase as modified by islet-activating protein, pertussis toxin, in mouse 3T3 fibroblasts.
Arch. Biochem. Biophys. 221, 381-390

Nakamura, T., Ui, M. (1985)
Simultaneous inhibitions of inositol phospholipid breakdown, arachidonic acid release, and histamine secretion in mast cells by islet-activating protein, pertussis toxin.
J. Biol. Chem. 260, 3584-3593

Neer, E.J., Lok, J.M., Wolf, L.G. (1984)
Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide regulatory unit of brain adenylate cyclase.
J. Biol. Chem. 259, 14222-14229

Nelson, T.Y., Oberwetter, J.M., Chafouleas, J.G., Boyd, A.E. (1983)
Calmodulin-binding proteins in a cloned rat insulinoma cell line.
Diabetologia 32, 1126-1134

Nelson, C.A., Seamon, K.B. (1985)
Regulation of (^{3}H)forskolin binding to human platelet membranes by GppNHp, NaF, and prostaglandin E_1.
FEBS Lett. 183, 349-352

Northup, J.K., Smigel, M.D., Gilman, A.G. (1982)
The guanine nucleotide activating site of the regulatory component of adenylate cyclase: Identification by ligand binding.
J. Biol. Chem. 257, 11416-11423

Northup, J.K., Sternweis, P.C., Gilman, A.G. (1983)
The subunits of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase. Resolution, activity, and properties of the 35000-dalton (ß) subunit.
J. Biol. Chem. 258, 11361-11368

Oie, H.K., Gazdar, A.F., Minna, J.D., Weir, G.C., Bayline, S.B. (1983)
Clonal analysis of insulin and somatostatin secretion and L-Dopa decarboxylase expression by a rat islet cell tumor.
Endocrinology 112, 1070-1075

Orly, J., Schramm, M. (1976)
Coupling of catecholamine receptor from one cell with adenylate cyclase from another cell by cell fusion.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 4410-4414

Owens, J.R., Frame, L.T., Ui, M., Cooper, D.M.F. (1985)
Cholera toxin ADP-ribosylates the islet-activating protein substrate in adipocyte membranes and alters its function.
J. Biol. Chem. 260, 15946-15952

Oye, I., Sutherland, E.W. (1966)
The effect of epinephrine and other agents on adenyl cyclase in the cell membrane of avian erythrocytes.
Biochim. Biophys. Acta 127, 347-354

Ozawa, Y., Chopra, I.J., Solomon, D.H., Smith, F. (1979)
The role of sulfhydryl groups in thyrotropin binding and adenylate cyclase activities of thyroid plasma membranes.
Endocrinology 105, 1221-1225

Peterson, G.L. (1977)
A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable.
Anal. Biochem. 83, 346-356

Pfeuffer, T., Metzger, H. (1982)
7-O-Hemisuccinyl-deacetyl forskolin-Sepharose: a novel affinity support for purification of adenylate cyclase.
FEBS Lett. 146, 369-375

Rabin, R.A., Mulinoff, P.B. (1981)
Activation of adenylate cyclase by ethanol in mouse striatal tissue.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 216, 129-134

Rink, H. (1974)
Thiol compounds in radiation biology.
Glutathione. Proc. 16th Conference German Soc. Biol. Chem., 206-216, , Thieme Verlag, Stuttgart (Flohe/Benöhr/Sies/Waller/Wendel eds.)

Rodbell, M. (1980)
The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction.
Nature 284, 17-22

Roos, I., Crompton, M., Carafoli, E. (1978)
The effect of phosphoenol pyruvate on the retention of calcium by liver mitochondria.
FEBS lett. 4, 418-421

Ross, E.M., Gilman, A.G. (1980)
Biochemical properties of hormone-sensitive adenylate cyclase.
Annu. Rev. Biochem. 49, 533-564

Ross, E.M. (1982)
Phosphatidylcholine-promoted interaction of the catalytic and regulatory proteins of adenylate cyclase.
J. Biol. Chem. 257, 10751-10758

Rutten, W. J., De Pont, J.J., Bonting, S.L. (1972)
Adenylate cyclase in the rat pancreas properties and stimulation by hormones.
Biochim. Biophys. Acta 274, 201-213

Salomon, Y., Londos, C., Rodbell, M. (1974)
A highly sensitive adenylate cyclase assay.
Anal. Biochem. 58, 541-548

Salter, R.S., Krinks, M.H., Klee, C.B., Neer, E.J. (1981)
Calmodulin activates the isolated catalytic unit of brain adenylate cyclase.
J. Biol. Chem. 256, 9830-9833

Samols, E., Marri, G., Marks, V. (1965)
Promotion of insulin secretion by glucagon.
Lancet 2, 415-416

Schramm, M., Naim, E. (1970)
Adenyl cyclase of rat parotid gland. Activation by fluoride and norepinephrine.
J. Biol. Chem. 245, 3225-3231

Schubart, U.K., Ehrlichman, J., Fleischer, N. (1982)
Regulation of insulin release and protein phosphorylation by calcium and cyclic AMP: possible role for calmodulin.
Calcium Cell Funct. 3, 381-407, Academic Press, NY (Cheung ed.)

Seamon, K.B., Daly, J.W. (1981)
Forskolin: a unique diterpene activator of cyclic AMP-generating systems.
J. Cyclic Nucl. Res. 7, 201-224

Seamon, K.B., Padgett, W., Daly, J.W. (1981a)
Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and intact cells.
Proc. National Acad. Sci. USA 78, 3363-3367

Seamon, K.B., Daly, J.W. (1982)
Guanosine 5-(ß,γ-imido) triphosphate inhibition of forskolin-activated adenylate cyclase is mediated by the putative inhibitory guanine nucleotide regulatory protein.
J. Biol. Chem. 257, 11591-11596

Seamon, K.B., Daly, J.W., Metzger, H., de Souza, N.J., Reden, J. (1983)
Structure-activity relationships for activation of adenylate cyclase by the diterpene forskolin and its derivatives.
J. Med. Chem. 26, 436-439

Seamon, K.B., Wetzel, B. (1984)
Interaction of forskolin with dually regulated adenylate cyclase.
Adv. Cycl. Nucl. Prot. Phosphor. Res. 17, 91-99

Seamon, K.B., Daly, J.W. (1985)
High-affinity binding of forskolin to rat brain membranes.
Adv. Cycl. Nucl. Prot. Phosphor. Res. 19, 125-135

Sehlin, J. (1976)
Calcium uptake by subcellular fractions of pancreatic islets. Effects of nucleotides and theophylline.
Biochem. J. 156, 63-69

Sener, A., Hutton, J.C., Kawazu, S., Boschero, A.C., Somers, G., Devis, G., Herchuelz, A., Malaisse, W.J. (1978)
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Metabolic and functional effects of NH_4^+ in rat islets.
J. Clin. Invest. 62, 868-878

Sener, A., Malaisse, W.J. (1984)
Nutrient metabolism in islet cells.
Experientia 40, 1026-1035

Sharp, G.W.G. (1979)
The adenylate cyclase - cyclic AMP system in islets of Langerhans and its role in the control of insulin release.
Diabetologia 16, 287-296

Sharp, G.W.G., Wiedenkeller, D.E., Kaelin, D., Siegel, E.G., Wollheim, C.B. (1980)
Stimulation of adenylate cyclase by Ca^{2+} and calmodulin in rat islets of Langerhans. Explanation for the glucose-induced increase in cyclic AMP.
Diabetes 29, 74-77

Siegel, E.G., Creutzfeldt, W. (1985)
Stimulation of insulin release in isolated rat islets by GIP in physiological concentrations and its relation to islet cyclic AMP content.
Diabetologia 28, 857-861

Sloboda, R.D., Rudolph, S.A., Rosenbaum, J.L., Greengard, P. (1975)
Cyclic AMP dependent endogenous phosphorylation of a microtubule-associated protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 177-181

Steinberg, J.P., Leitner, J.W., Draznin, B., Sussman, K.E. (1984)
Calmodulin and cyclic AMP. Possible different sites of action of these two regulatory agents in exocytotic release.
Diabetes 33, 339-345

Steiner, A.L., Parker, C.W., Kipnis, D.M. (1972)
Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. I. Preparation of antibodies and iodinated cyclic nucleotides.
J. Biol. Chem. 247, 1106-1113

Steiner, A.L., Wehman, R.A., Parker, C.W., Kipnis, D.M. (1972)
Radioimmunoassay for the measurement of cyclic nucleotides.
Adv. Cycl. Nucl. Res. 2, 51

Stengel, D., Guenet, L., Desmier, M., Insel, P., Hanoune, J. (1982)
Forskolin requires more than the catalytic unit to activate adenylate cyclase.
Mol. Cell. Endocrinol. 28, 681-690

Sternweis, P.C., Robishaw, J.D. (1984)
Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain.
J. Biol. Chem. 259, 13806-13813

Stiles, G.L., Lefkowitz, R.J. (1982)
Hormone-sensitive adenylate cyclase. Delineation of a trypsin-sensitive site in the pathway of receptor-mediated inhibition.
J. Biol. Chem. 257, 6287-6291

Stiles, G.L., Caron, M.C., Lefkowitz, R.C. (1984)
ß-adrenergic receptors: Biochemical mechanisms of physiological regulation.
Physiol. Rev. 64, 661-743

Stock, K., Schmidt, M. (1978)
Effects of short-chain alcohols on adenylate cyclase in plasma membranes of rat adipocytes.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 302, 37-43

Storm, D.R., Dolginow, Y.D. (1973)
Glucagon stimulation of adenylate cyclase sulfhydryl reactivity. Evidence for hormone-induced conformational changes.
J. Biol. Chem. 248, 5208-5210

Sudgen, M.C., Ashcroft, S.J.H. (1978)
Effects of phosphoenolpyruvate, other glycolytic intermediates and methylxanthines on calcium uptake by a mitochondrial fraction from rat pancreatic islets.
Diabetologia 15, 173-180

Sudgen, M.C., Christie, M.R., Ashcroft, S.J.M. (1979)
Presence and possible role of calcium-dependent regulator (calmodulin) in rat islets of Langerhans.
FEBS Lett. 105, 95-100

Summers, S.T., Cronin, M.J. (1986)
Phorbol esters enhance basal and stimulated adenylate cyclase activity in a pituitary cell line.
Biochem. Biophys. Res. Com. 135, 276-281

Sutherland, E.W., Rall, T.W., (1957)
The properties of an adenine ribonucleotide produced with cellular particles, ATP, Mg^{2+}, and epinephrine or glucagon.
J. Amer. Chem. Soc. 79, 3608

Sutherland, E.W., Robison, G.A. (1966)
The role of cyclic -3',5'-AMP in responses to catecholamines and other hormones.
Pharmacol. Rev. 18, 145-161

Täljedal, I.-B. (1978)
Chlorotetracycline as a fluorescent Ca^{2+} probe in pancreatic islet cells.
J. Cell. Biol. 76, 652-674

Tanigawa, K., Kuzuya, H., Imura, H., Taniguchi, H., Baba, S., Tako, Y., Nishizuka, Y. (1982)
Calcium-activated phospholipid-dependent proteinkinase in rat pancreas islets of Langerhans. Its possible role in glucose-induced insulin release.
FEBS Lett. 138, 183-186

Thams, P., Capito, K., Hedeskov, C.J. (1982)
Differential effects of Ca^{2+}-calmodulin on adenylate cyclase activity in mouse and rat pancreatic islets.
Biochem. J. 206, 97-102

Thams, P., Capito, K., Hedeskov, C.J. (1984)
Characteristics of an adenylate cyclase enhancing factor from mouse pancreatic islet cytosol.
Diabetologia 26, 375-378

Thompson, W.J., Johnson, D.G., Williams, R.H. (1976)
Hormonal regulation of pancreatic islet adenyl cyclase.
Biochemistry 15, 1658-1663

Tomasi, J., Koretz, S., Ray, T.K., Dumid, J., Marinetti, G.U. (1970)
Hormone action at the membrane level. II. The binding of epinephrine and glucagon to the rat liver plasma membrane.
Biochim. Biophys. Acta 211, 31

Turtle, J.R., Kipnis, D.M. (1967)
An adrenergic receptor mechanism for the control of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate synthesis in tissues.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 797-802

Unger, R.H. (1981)
The milieu interieur and the islets of Langerhans.
Diabetologia 20, 1-11

Valverde, I., Vandemeers, A., Anjaneyulu, R., Malaisse, W.J. (1979)
Calmodulin activation of adenylate cyclase in pancreatic islets.
Science 206, 225-227

Valverde, J., Malaisse, W.J., (1984)
Calmodulin and pancreatic B-cell function.
Experientia 40, 1061-1068

Vauquelin, G., Maguire, M.-E. (1980)
Inactivation of ß-adrenergic receptors by N-ethylmaleimide in S49 lymphoma cells.
Mol. Pharmacol. 18, 362-369

Verspohl, E.J., Händel, M., Ammon, H.P.T. (1979)
Pentosephosphat shunt activity of rat pancreatic islets: Its dependence on glucose concentration.
Endocrinology 105, 1269-1274

Verspohl, E.J., Ammon , H.P.T. (1980)
Evidence for presence of insulin receptors in rat islets of Langerhans.
J. Clin. Invest. 65, 1230-1237

Verspohl, E.J., Ammon, H.P.T., Williams, J.A., Goldfine, I.D.
Evidence that cholecystokinin interacts with specific receptors and regulates insulin release in isolated rat islets of pancreas.
Diabetes 35, 38-43

Vogt, M.T., Thomas, C., Vassallo, C.L., Basford, R.E., Gee, J.B.L. (1971)
Glutathion-dependent peroxidation metabolism in the alveolar macrophage.
J. Clin. Invest. 50, 401-410

Watanabe, Y., Horn, F., Bauer, S., Jakobs, K.H. (1985)
Protein kinase C interferes with N_i-mediated inhibition of human platelet adenylate cyclase.
FEBS Lett. 192, 23-27

Wiedenkeller, D.E., Sharp, G.W.G. (1983)
Effect of forskolin on insulin release and cyclic AMP content in rat pancreatic islets.
Endocrinology 113, 2311-2313

Wollheim, C.B., Blondel, B., Sharp, G.W.G. (1974)
Effect of cholera toxin on insulin release in monlayer cultures of the endocrine pancreas.
Diabetologia 10, 783-787

Wollheim, C.B., Sharp, G.W.G. (1981)
Regulation of insulin release by calcium.
Physiol. Rev. 61, 914-973

Wollheim, C.B., Pozzan, T. (1984)
Correlation between cytosolic free Ca^{2+} and insulin release in an insulin-secreting cell line.
J. Biol. Chem. 259, 2262-2267

Yajima, M., Hosoda, K., Kanbaysahi, Y., Nakassura, T., Nogimori, K., Nakase, Y., Ui, M. (1978)
Islet-activating protein (IAP) in Bordetella pertussis that potentiates insulin secretory responses of rats. Purification and characterization.
J. Biochem. 83, 295-303

Zawalich, W.S., Karl, R.C., Ferrendelli, J.A., Matschinsky, F.M. (1975)
Factors governing glucose-induced elevation of cyclic 3',5'-AMP levels in pancreatic islets.
Diabetologia 11, 231-235

LEBENSLAUF

Klaus Joachim Trier

geboren am 28. Dezember 1958

Eltern: Klaus Trier, Amtsrat und

Edith Trier, geb. Wieland

Schulischer Werdegang:

1965-1969	Besuch der Grundschule in Weingarten, Kreis Ravensburg
1969-1978	Besuch des Albert-Einstein-Gymnasiums in Ravensburg vom August 1969 bis Mai 1978 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife am 23. Mai 1978

Beruflicher Werdegang:

1978-1982	Beginn des Pharmaziestudiums an der Universität Tübingen im Oktober 1978
	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung am 4. September 1980
	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung am 5. April 1982
1982-1983	Pharmaziepraktikum in der Frauentor-Apotheke in Ravensburg
	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung am 5. Mai 1983
	Erteilung der Approbation als Apotheker am 5. Mai 1983
1983-1986	Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation im Mai 1983 bei Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon am Lehrstuhl für Pharmakologie am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen
	Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Pharmakologie von Juli 1984 bis Juli 1986
	Abschluß der experimentellen Arbeiten zur Dissertation im Februar 1986

Druck und Gesamtherstellung: Druckerei Bölk, Tübingen